agronomía&ambiente
Revista de la Facultad de Agronomía UBA
36 (2)

PODREDUMBRE NEGRA EN YUCA AMARILLA (*Manihot esculenta Crantz*) CAUSADA POR *Thielaviopsis basicola*.

Luis Cedeño[(1)]; Gustavo Fermin[(2)]; Romina Ruiz-Arellano[(3)]; Chrystian Carrero[(1)†]; Néstor Morales[(1)]; Henry Pino[(1)] y Kleyra Quintero[(1)]

[(1)]Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales,
[(2)]Laboratorio de Biodiversidad y Variabilidad Molecular, Instituto Jardín Botánico de Mérida, Facultad de Ciencias,
[(3)]Centro de Microscopia Electrónica "Dr. Ernesto Palacios Prü"
Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. cedenol@ula.ve

Recibido: 04-05-2016
Aceptado:: 27-08-2016

RESUMEN

Por primera vez se reporta al hongo *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferris, como causa de podredumbre negra en las raíces comestibles de yuca amarilla. Para aislar el patógeno se utilizaron cebos preparados con raíces frescas y sanas de zanahoria. El hongo produjo sus estructuras reproductivas sobre raíces de yuca infectadas naturalmente y de zanahoria inoculadas experimentalmente. La identidad del organismo se determinó sobre la base de las características morfométricas de sus estructuras reproductivas y a través de análisis molecular por secuenciación de la región génica del rDNA, incluyendo las regiones variables *ITS1* e *ITS2*. Pruebas de patogenicidad y reaislamientos confirmaron los postulados de Koch.

Palabras clave: Yuca, Casava, Tapioca, pudrición negra, *Ceratocystis, Chalara, ITS*

BLACK ROT DISEASE ON YELLOW-COLORED CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz) CAUSED BY *Thielaviopsis Basicola*

SUMMARY

A fungus identified as *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferris, causing a black rot disease on edible roots of yellow-colored cassava, is reported for the first time. Baits prepared with fresh and healthy roots of carrot were used to isolate the pathogen. The fungus produced their asexual reproductive structures on cassava roots infected naturally, and on carrot roots inoculated experimentally. The identity of the organism was determined based on the morphometric characteristics of the reproductive structures, and the molecular analysis of the rDNA gene coding sequence, including the *ITS1* and *ITS2* variable regions. Pathogenicity and reisolation tests confirmed the Koch`s postulates.

Key words: Cassava, black rot, *Ceratocystis, Chalara, ITS*

9 cedeño 2.indd 96 3/1/2017 2:29:36 p. m.

INTRODUCCIÓN

La yuca, especie de planta reconocida científicamente como *Manihot esculenta* Crantz, es una Euphorbiaceae cuyo centro de origen ha sido ubicado en la cuenca Amazónica, al norte de Brasil (Suarez y Mederos, 2011). De manera casi permanente, las raíces comestibles de la yuca ocupan lugar común en la mesa de los venezolanos cuya disponibilidad económica varía entre deficiente y moderada. La planta contiene niveles muy significativos de proteínas y energía y, además, se caracteriza por poseer una amplia capacidad de adaptación. Crece bien en suelos ácidos y/o de baja fertilidad, en sitios con largos periodos de sequía o donde las precipitaciones son esporádicas; no es muy exigente en cuanto a labores agrícolas y son muy pocas las plagas y enfermedades que, hasta ahora, ponen en riesgo su ciclo vital (Suarez y Mederos, 2011). Por lo antes expuesto, la yuca se vislumbra como el rubro agrícola que ofrece más y mejores posibilidades para satisfacer las exigencias nutricionales de la población mundial, especialmente la que habita en países que no disponen de recursos económicos suficientes para importar alimentos.

Entre los 103 países del mundo productores de yuca, en el año 2012 Venezuela ocupó el puesto 38, con más de medio millón de toneladas cosechadas (FAOSTAT, 2014). Entre los que producen más de diez millones de toneladas/año se destacan varios países africanos (Nigeria con 54.000.000 toneladas/año, República Democrática del Congo con 16.000.000 toneladas/año, Ghana con más de 14.000.000 toneladas/año, y Angola y Mozambique con más de 10.000.000 toneladas/año cada uno), así como Indonesia con casi 24.000.000 toneladas/año, Brasil con 23.000.000 toneladas/año y Tailandia con 22.500.000 toneladas/año. En el caso particular de nuestro país, como se observa en la figura 1, puede aseverarse que la producción está estancada con bajos niveles de producción debido, entre otras cosas, a una disminui-

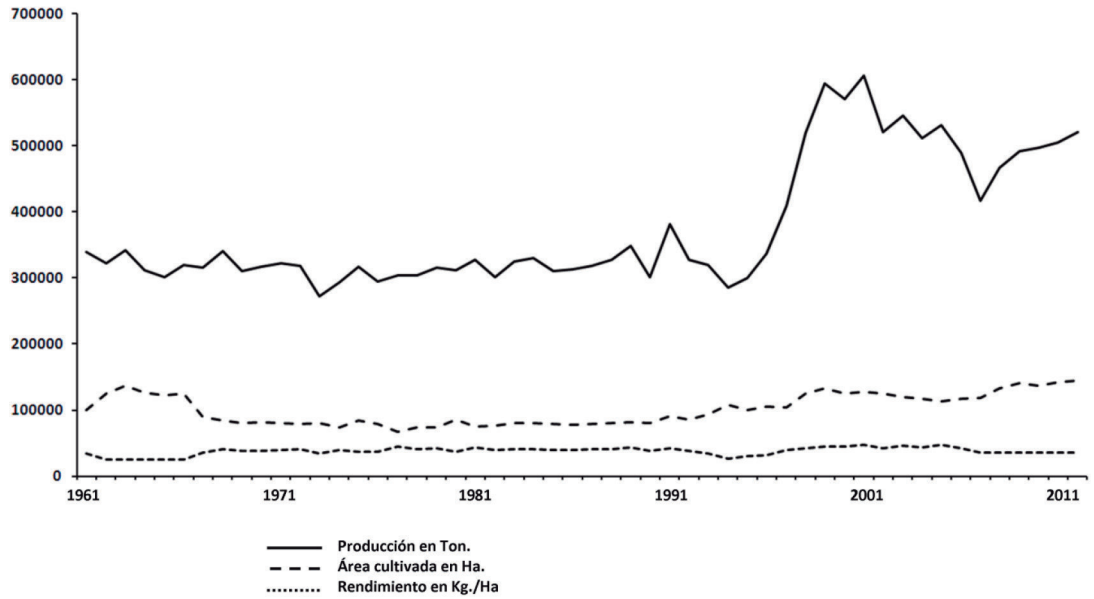

Figura 1: Comportamiento en la producción de yuca en Venezuela durante los últimos 52 años (1961-2012). A pesar del sorpresivo aumento durante el periodo 1996-2001, la producción no ha logrado mantener un crecimiento sostenido; por el contrario, parece haber perdido ímpetu y actualmente la producción, área de cultivo y rendimiento se encuentran estancadas (datos tomados de FAOSTAT, 2014).

9 cedeño 2.indd 97 3/1/2017 2:29:37 p. m.

da área de cultivo y un rendimiento despreciable (FEDEAGRO, 2014; FAOSTAT, 2014).

En la región de la Cordillera de Los Andes que corresponde a Venezuela, se cultivan dos tipos de yuca que se distinguen por el color de la porción interna de las raíces comestibles: la yuca blanca, que es la de mayor consumo, y la amarilla, cuya producción está limitada a sectores aislados de los estados Mérida, Táchira y Trujillo. Por su aspecto llamativo, exquisito sabor y menor tiempo de cocción, la demanda de yuca amarilla es permanente e importante; sin embargo, la acompaña la desventaja de tener una vida útil post-cosecha mucho más corta que la de la yuca blanca. La yuca amarilla, por otra parte, debe su color a una mayor concentración de vitamina A, lo que ha permitido en Nigeria la generación por medios convencionales de yucas amarillas con mayores niveles de β-caroteno, precursor de este importante compuesto nutricional (Bradbury, 1988).

A partir de mayo del año 2011, el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad de Los Andes, acumuló información sobre la aparición de una enfermedad de "Podredumbre negra" que altera la calidad y cantidad de la yuca amarilla que se cosecha en la zona árida del estado Mérida, específicamente en el Asentamiento Campesino Santo Domingo, ubicado en la Parroquia Estanques del Municipio Sucre. Es importante destacar que el asentamiento en cuestión incluye seis sectores donde durante el año 2010 se cultivaron aproximadamente 15 ha de yuca amarilla. Para los Andes venezolanos, particularmente para el área que abarca el Municipio Sucre del estado Mérida, la yuca de raíz amarilla representa una etiqueta de identidad regional, puesto que es una de las pocas áreas del país donde se cultiva ésta muy solicitada delicia culinaria. En consecuencia, todo evento que amenace con hacer desaparecer este cultivo, o en afectar sustancialmente su cantidad y calidad, adquiere una importancia relevante y merece ser investigado con urgencia para definir y aplicar las medidas de prevención y control más apropiadas en cuanto a economía y resguardo ambiental.

Considerando la relevancia económica y social que tiene la yuca amarilla para los agricultores y consumidores de la región, el objetivo principal de la investigación que se reporta fue identificar el microorganismo causante de la enfermedad, a los fines de generar los conocimientos básicos necesarios para posteriormente proceder a evaluar y definir las estrategias de prevención y control más económicas y de menor impacto ambiental. De esta manera, se garantizará que reconocidos grupos de productores de yuca amarilla continúen realizando su actividad sin enfrentar las limitaciones que implica la presencia de la referida enfermedad, e igualmente, que los consumidores tengan fácil acceso a este rubro en cantidad suficiente y en condiciones que garanticen su inocuidad y calidad tanto estética como nutricional.

Thielaviopsis basicola (sinanamorfo *Chalara elegans*), anamorfo de una *Ceratocystis*, es un hongo del suelo con distribución cosmopolita que causa enfermedades en un amplio grupo de especies de plantas pertenecientes a más de 137 géneros distintos, incluyendo, entre otros, chicoria (*Cichorium intybus*), habas (*Vicia faba*), algodón (*Gossypium hirsutum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y zanahoria (*Daucus carota*) (Geldenhuis *et al*., 2006). En este artículo se presenta por primera vez la descripción morfológica de un aislado de *T. basicola* que causa podredumbre negra en yuca, así como la evidencia molecular de su identidad específica.

La fase sexual de *T. basicola* pertenece al Complejo *Ceratocystis*, uno de los grupos de fitopatógenos fúngicos más complicados y difíciles de definir. Los ascomycetes identificados a este nivel genérico pertenecen al orden microascales, cuyos miembros típicamente presentan a nivel morfológico bases ascomatales bulbosas con cuellos extendidos (fase sexual) y fiálides tubulares (fase asexu-

9 cedeño 2.indd 98 3/1/2017 2:29:37 p. m.

al). Estos importantes fitopatogénos fúngicos han sido objeto de amplios estudios a nivel ecológico, morfológico y molecular en los últimos años, lo cual ha conducido a la propuesta de nuevas especies que han complicado aún más el estatus de nuestra comprensión taxonómica y evolutiva del grupo. Particularmente tomando en consideración que hasta la fecha no existen caracteres morfológicos diagnósticos que de manera inequívoca permitan la identificación confiable, rápida y sencilla de sus miembros (Johnson *et al.,* 2005). Una aproximación integracionista, sin embargo, que incluya los aspectos antes señalados, además de los aspectos ecológicos de la especie, podrían a futuro ayudar a definir mejor los límites que separan a los miembros del grupo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación del patógeno

El material seleccionado para realizar los aislamientos fue colectado en el sector La Cancha del asentamiento campesino Santo Domingo, Parroquia Estanques, Municipio Sucre del estado Mérida, Venezuela. Para aislar el patógeno de manera rápida y efectiva, se modificó el medio selectivo desarrollado por Moller y De Vay (1968). Las raíces de yuca con síntomas de podredumbre negra fueron primeramente lavadas con agua corriente durante 30 minutos, y luego, del margen de las lesiones se cortaron pequeños fragmentos de tejido infectado que inmediatamente fueron sumergidos por 1 minuto en solución de hipoclorito de sodio 0,5%, lavados en tres cambios de agua destilada esterilizada (ADE), secados y sembrados en el interior de perforaciones provocadas con un sacabocado estéril de 0,5 cm de diámetro, en zanahorias frescas, sanas, descontaminadas por 5 minutos con hipoclorito de sodio 1% y lavadas varias veces con ADE. Seguidamente, en la perforación se introdujo el cilindro extraído con el sacabocado y la herida se cubrió con cinta Parafilm®. Los aislados obtenidos fueron posteriormente sub-cultivados en placas con Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Extracto de Malta-Agar (EMA), e igualmente sobre rodajas de zanahorias tratadas como se indicó previamente. La identificación se hizo sobre la base de criterios fitopatológicos tradicionales (morfología y dimensiones de las estructuras reproductivas) y confirmada mediante análisis molecular (PCR, secuenciación y análisis bio-informático de la secuencia obtenida). Para tales propósitos se utilizaron cultivos monoconidiales

Análisis molecular del patógeno:

Extracción del ADN. De colonias crecidas en PDA se cosechó micelio que inmediatamente fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1,5ml que contenía 70µl de solución R (100mM NaCl, 10mM de tris-Cl pH 7,5, 1mM EDTA y SDS al 1%). Seguidamente, el tubo fue colocado por 15 minutos en baño de María a 95ºC, y posteriormente incubado en hielo durante 5 minutos (Ma y Michailides, 2002). A la preparación se le agregaron 100µl de cloroformo, y después de agitarla se centrifugó por 2 minutos a máxima velocidad. La fase acuosa fue recuperada y mezclada con un volumen de isopropanol 100%, procediendo luego a centrifugar durante 5 minutos a la misma velocidad previamente indicada. Al pellet se le adicionó un volumen de etanol 70% e inmediatamente se procedió a centrifugar la preparación por 1 minuto a máxima velocidad. Descartada la solución de lavado, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos, y seguidamente el ADN fue resuspendido en 20 µl de ADE (Sambrook y Russell, 2001). La concentración y calidad del ADN se verificó con electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, el cual contenía 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 minutos. Para preparar el gel y realizar la corrida se utilizó el tampón TAE 1X (40 mM de Tris-Acetato y 1mM de EDTA), según Sambrook y Russell (2001). El ADN total fue visualizado con transiluminador UV, y el registro fotográfico se hizo con cámara fotográfica digital HP Photosmart R717.

9 cedeño 2.indd 99 3/1/2017 2:29:37 p. m.

Amplificación. Mediante PCR se amplificó la región que abarca el primer espaciador interno (*ITS1*), el gen *5.8S rRNA* completo y el segundo espaciador interno (ITS2), utilizando los cebadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') reportados previamente (Slippers *et al*., 2005), en una mezcla de reacción de 20 µl que contenía los cebadores y la GoTaq® Green Master Mix según las recomendaciones de los fabricantes (GoTaq® Green Master Mix 12,5 µl, cebadores 100 µM, ADN templado 10 ηg/µl, en un volumen de 25 µl) (Promega, Madison, MI). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720 con el siguiente programa de ciclos de amplificación: desnaturalización inicial a 94ºC por dos minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94ºC por 30 segundos, anillamiento a 53ºC por 60 segundos y extensión a 72ºC por 90 segundos, luego de lo cual se permitió la culminación de la reacción con un paso de extensión final a 72ºC por 5 minutos. Los fragmentos amplificados se observaron nítidamente, como bandas únicas, en una electroforesis horizontal realizada de la misma manera como se indicó anteriormente.

Secuenciación. El fragmento de interés fue precipitado con sales y etanol (Sambrook y Russell, 2001) y enviado a secuenciar por ambas bandas a MWG Operon (Alabama, USA). Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999), y posteriormente comparadas con la información disponible en la base de datos de dominio público GeneBank, aplicando el programa BLAST (Zhang *et al*., 2000).

Análisis de parentesco filogenético. A fin de verificar las relaciones de parentesco del aislado de yuca objeto de este estudio, se obtuvo primero el contig de la secuencia de ambas bandas mediante la aplicación CAP del programa BioEdit (Hall, 1999), luego de lo cual fue alineada con las secuencias de numerosos hongos del grupo (Cuadro 1). El alineamiento así obtenido fue posteriormente empleado para ensayar relaciones de parentesco (y origen geográfico de los aislados) con el programa MEGA6 (Tamura *et al*., 2013), en un análisis sencillo de 1000 repeticiones con los métodos de Máxima Verosimilitud y Neighbor Joining. Por otro lado, la secuencia del hongo fue comparada con otras reportadas para la misma especie a partir de diferentes hospedadores (Cuadro 2), tal como se muestra en la Figura 2.

Patogenicidad

En las pruebas de inoculación artificial se utilizaron raíces sanas cosechadas de plantas de yuca amarilla de 10 meses de edad, cultivadas bajo condiciones controladas de riego en sustrato esterilizado con Dazomet®. El material seleccionado fue descontaminado sumergiéndolo por 5 minutos en solución 1% de hipoclorito de sodio, procediendo luego a lavarlo varias veces con ADE. El inóculo se extrajo de colonias producidas en cápsulas de Petri que contenían PDA, las cuales permanecieron incubadas durante 21 días a temperatura ambiente (22°C ± 2) y bajo un régimen de 12 horas de luz fluorescente y 12 horas de oscuridad. Las raíces se inocularon sin heridas en la cascara y con heridas circulares elaboradas con sacabocados de 9 mm de diámetro esterilizado. En el interior de estas heridas se depositaron discos de PDA-micelio del mismo diámetro. Inmediatamente después de la inoculación, las heridas se cubrieron con los mismos discos de cáscara extraídos previamente. Como testigo se emplearon ocho raíces (4 con heridas y 4 sin heridas, sin inoculación). Todo el material se incubó en condiciones de cámara húmeda preparada con bandejas de plástico, papel absorbente esterilizado y ADE. Las bandejas se colocaron sobre los mesones del laboratorio a temperatura ambiente (22°C ± 2). La prueba de patogenicidad se repitió dos veces. Para confirmar los postulados de Koch, a partir de los materiales contaminados experimentalmente se hicieron reaislamientos en rodajas de zanahoria.

9 cedeño 2.indd 100 3/1/2017 2:29:37 p. m.

Cuadro 1: Secuencias empleadas para el análisis de las relaciones de parentesco entre especies del complejo *Ceratocystis* (incluyendo los anamorfos *Thielaviopsis*, KT758844).

Accesión GenBank	País de origen	Especie putativa	Hospedador
KT758844	Venezuela	T. *basicola*	*Manihot esculenta*
KC691452	Sudáfrica1	C. *albifundus*	*Terminalia sericea*
KC691453	Sudáfrica2	C. *albifundus*	*Combretum zeyheri*
KC691454	Sudáfrica3	C. *thulamelensis*	*Combretum zeyheri*
KC691455	Sudáfrica4	C. *thulamelensis*	*Combretum zeyheri*
KC691456	Sudáfrica5	C. *thulamelensis*	*Colophospermum mopane*
KC691457	Sudáfrica6	C. *thulamelensis*	*Colophospermum mopane*
KC691458	Sudáfrica7	C. *zambeziensis*	*Combretum imberbe*
KC691459	Sudáfrica8	C. *zambeziensis*	*Combretum imberbe*
KC691460	Sudáfrica9	C. *zambeziensis*	*Schotia brachypetala*
KC691461	Sudáfrica10	C. zambeziensis	Acacia nigrescens
KC691462	Sudáfrica11	C. *cryptoformis*	*Terminalia sericea*
KC691463	Sudáfrica12	C. *cryptoformis*	*Combretum zeyheri*
KC691464	Sudáfrica13	C. cryptoformis	Ziziphus mucronata
KC691465	Sudáfrica14	C. cryptoformis	Combretum hereroense
KC691466	Sudáfrica15	C. *oblonga*	*Ziziphus mucronata*
KC691467	Sudáfrica16	C. *oblonga*	*Colophospermum mopane*
KC691468	Sudáfrica17	C. *savannae*	*Combretum imberbe*
KC691469	Sudáfrica18	C. *savannae*	*Colophospermum mopane*
KC691470	Sudáfrica19	T. *basicola*	*Acacia grandicornuta*
KC691471	Sudáfrica20	T. *basicola*	*Acacia grandicornuta*
KC691472	Sudáfrica21	T. *basicola*	*Colophospermum mopane*
KC691473	Sudáfrica22	T. *thielavioides*	*Pseudolachnostylis sp.*
KC691474	Sudáfrica23	T. *thielavioides*	*Philenoptera violacea*
KC691475	Sudáfrica24	T. *thielavioides*	*Carpophilus hemipterus*
AY528957	Asia1: Bután	C. *bhutanensis*	*Picea spinulosa/Cassia fistula*
AY528956	Asia2: Bután	C. *bhutanensis*	*Picea spinulosa/Cassia fistula*
EU588587	Asia3: Indonesia	C. inquinans	*Acacia mangium*
EU588588	Asia4: Indonesia	C. *inquinans*	*Acacia mangium*
EU588592	Asia5: Indonesia	C. *microbasis*	*Acacia mangium*
EU588593	Asia6: Indonesia	C. *microbasis*	*Acacia mangium*
EU588589	Asia7: Indonesia	C. *sumatrana*	*Acacia mangium*
EU588590	Asia8: Indonesia	C. *sumatrana*	*Acacia mangium*
DQ074743	Asia9: Omán	C. *omanensis*	*Mangifera indica*
DQ074742	Asia10: Omán	C. *omanensis*	*Mangifera indica*
AY528997	Indopacífico1: Ecuador	C. *moniliformis*	*Schizolobium parahybum*
AY431101	Indopacífico2 (South Africa)	C. *moniliformis*	*Eucalyptus grandis*
FJ151431	Indopacífico3: Ecuador	C. *sublaevis*	*Terminalia ivorensis*
FJ151430	Indopacífico4: Ecuador	C. *sublaevis*	*Terminalia ivorensis*
HM071899	Indopacífico5: Australia	C. *tyalla*	*Eucalyptus grandis*
HM071896	Indopacífico6: Australia	C. *tyalla*	*Eucalyptus grandis*
AY529002	Indopacífico8: Indonesia	C. *tribiliformis*	*Pinus merkusii*
FJ236723	Sudamérica1: es Sudáfrica	C. *eucalypticola*	*Eucalyptus*
AY177233	Sudamérica2: Colombia	C. *colombiana*	*Suelo de plantaciones de café (Coffea arabica)*
AY233863	Sudamérica3: Colombia	C. *colombiana*	*Citrus reticulata*
DQ520637	Sudamérica4:	C. *cacaofunesta*	*Theobroma cacao*
AF264904	Sudamérica5: Papúa Nueva Guinea	C. *fimbriata*	*SD*
DQ520629	Sudamérica6: USA	C. *fimbriata*	*SD*
FJ236722	Sudamérica7: Sudáfrica	C. *eucalypticola*	*Eucalyptus*
EU426553	Norteamérica1: USA	C. *smalleyi*	*Carya*
EF070423	Norteamérica2: USA	C. *caryae*	*Carya*
EF070424	Norteamérica3: USA	C. *caryae*	*Carya*
EF070418	Norteamérica4: USA	C. *populicola*	*Populus*
EF070419	Norteamérica5: USA	C. *populicola*	*Populus*
EF408556	Norteamérica6: SAfr	C. *tsitsikammensis*	*Rapaneae melanophloeos*
EF070422	Norteamérica7: USA	C. *variospora*	*Prunus*

SD: Sin Dato

9 cedeño 2.indd 101 3/1/2017 2:29:37 p. m.

Cuadro 2: Secuencias empleadas para la comparación de aislados de T. basicola a partir de distintos hospedadores (incluyendo el aislado de yuca de este estudio).

Accesión GenBank	País de origen	Hospedador
AF275481	SD	*Primula sp.*
AF275482	SD	*Betula sp.*
AF275493	SD	*Pelargonium sp.*
AF275494	SD	*Daucus sp.*
DQ059579	USA	*Nicotiana tabacum*
GQ131877	Italia	portainjerto de melocotón
HM031125	Australia	*Gossypium hirsutum*
HM031126	Australia	*Lactuca sativa*
KC191756	SD	Suelo de cultivo de algodón
KC305140	Sudáfrica	Chicory (*Cichorium intybus*)
KC305141	Sudáfrica	Chicory (*Cichorium intybus*)
KJ411644	México	*Daucus carota*
KJ715965	México	*Phaseolus vulgaris*
U97334	SD	SD

SD: Sin Dato

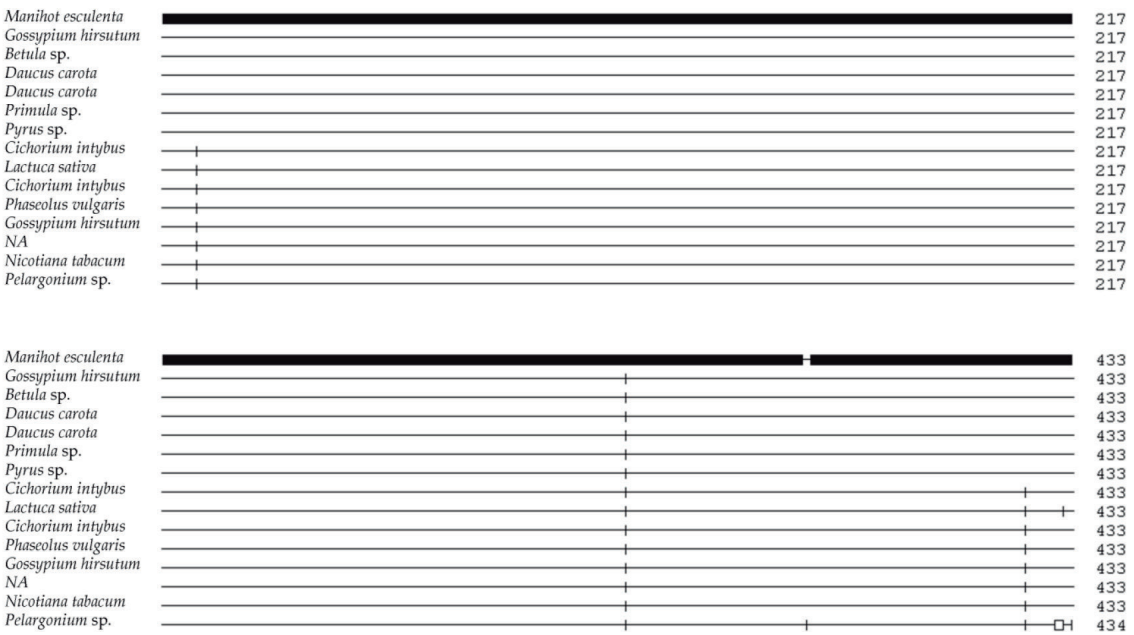

Figura 2: Esquema de la región génica empleada para el análisis de secuencia del aislado de *T. basicola* proveniente de un cultivo de yuca, comparado con secuencias del mismo gen y de la misma especie aislados a partir de otros hospedadores. Se señalan las diferencias como pequeñas líneas verticales en las secuencias de comparación con respecto al aislado de yuca (línea negra sólida). El punto de discontinuidad en la secuencia de yuca surge por inserción de un nucleótido en el aislado proveniente de *Pelargonium* (no compartido por ninguna de las otras secuencias).

9 cedeño 2.indd 102 3/1/2017 2:29:38 p. m.

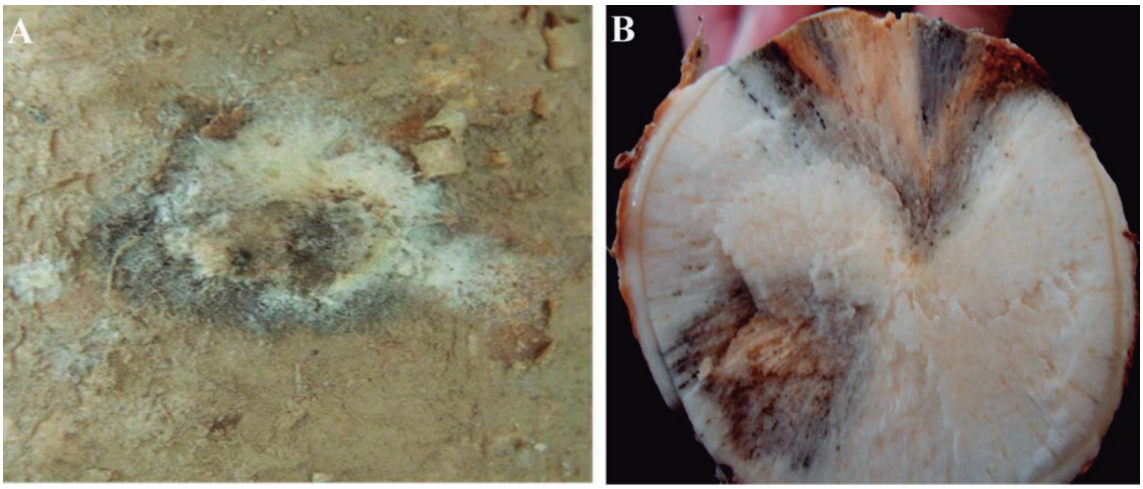

Figura 3: Síntomas externos (A) e internos (B) de la podredumbre negra que ataca las raíces comestibles de la yuca. En B, el corte transversal muestra que la infección avanza hacia el interior del órgano en forma de cuña

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntomas y signos de la enfermedad. En la cáscara de las raíces infectadas naturalmente se observaron manchas negras ligeramente hundidas de forma más o menos circular (Figura 3A). Cuando las raíces enfermas fueron seccionadas transversalmente por el área afectada, la infección se apreció avanzando radialmente hacia el centro en forma de cuña de color azul-verdoso (Figura 3B). Sobre la superficie de algunas manchas se encontraron dos tipos de estructuras asexuales conocidas unas como fialoconidias (Figs. 4A, B y C), y las otras como aleurioconidias (Figs. 4A, B y D).

Identificación del patógeno. Los cultivos del hongo se apreciaron verde-oliváceos y de ellos emanaba un aroma como el que se origina en las frutas en descomposición avanzada. Sobre las raíces de zanahoria y en el de cultivo EMA, el organismo produjo las mismas estructuras asexuales visualizadas en yuca infectada naturalmente. En EMA desarrolló fialoconidióforos que emergen lateralmente, solitarios y en grupos, a partir de hifas vegetativas, multiseptadas; fiálides lageniformes, hialinas a marrón-pálido; fialoconidias rectangulares, unicelulares, hialinas a marrón claro, pared celular delgada y con 7,2-25,2 µm de largo y 3,5-6,0 µm de ancho. Igualmente produjo aleurioconidióforos con 0-5 septos; aleurioconidias multicelulares (hasta 8 células), 4-7 septos, de color marrón-oscuro a negro, con pared celular gruesa, 36,0-85,0 µm de largo y 9,0-12,0 µm de ancho. En esta publicación llamamos aleurioconidia a la estructura multicelular, y clamidosporas a las células que la conforman. Las clamidosporas producidas *in vitro* presentaron 7,0-11,0 µm de alto x 8,0-12,0 µm de ancho.

Las fialoconidias provenientes de condiciones *in situ* midieron 10,0-20,0 x 3,0-4,0 µm; las aleurioconidias tuvieron 4-7 septos y midieron 35,0-65,0 x 9,0-12,0 µm.

En consideración de las características morfométricas el hongo se identificó como *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferris. *T. basicola* fue reproducido *in situ* e *in vitro* (zanahoria y EMA). Los resultados del análisis molecular confirmaron, con 99% de máxima identidad y 99% de cobertura, que el aislado secuenciado corresponde a la especie *T. basicola*, pero que la misma pertenece a un clado distinto de los registrados para los complejos *moniliformis* y *fimbriata*, aunque más relacio-

9 cedeño 2.indd 103 3/1/2017 2:29:38 p. m.

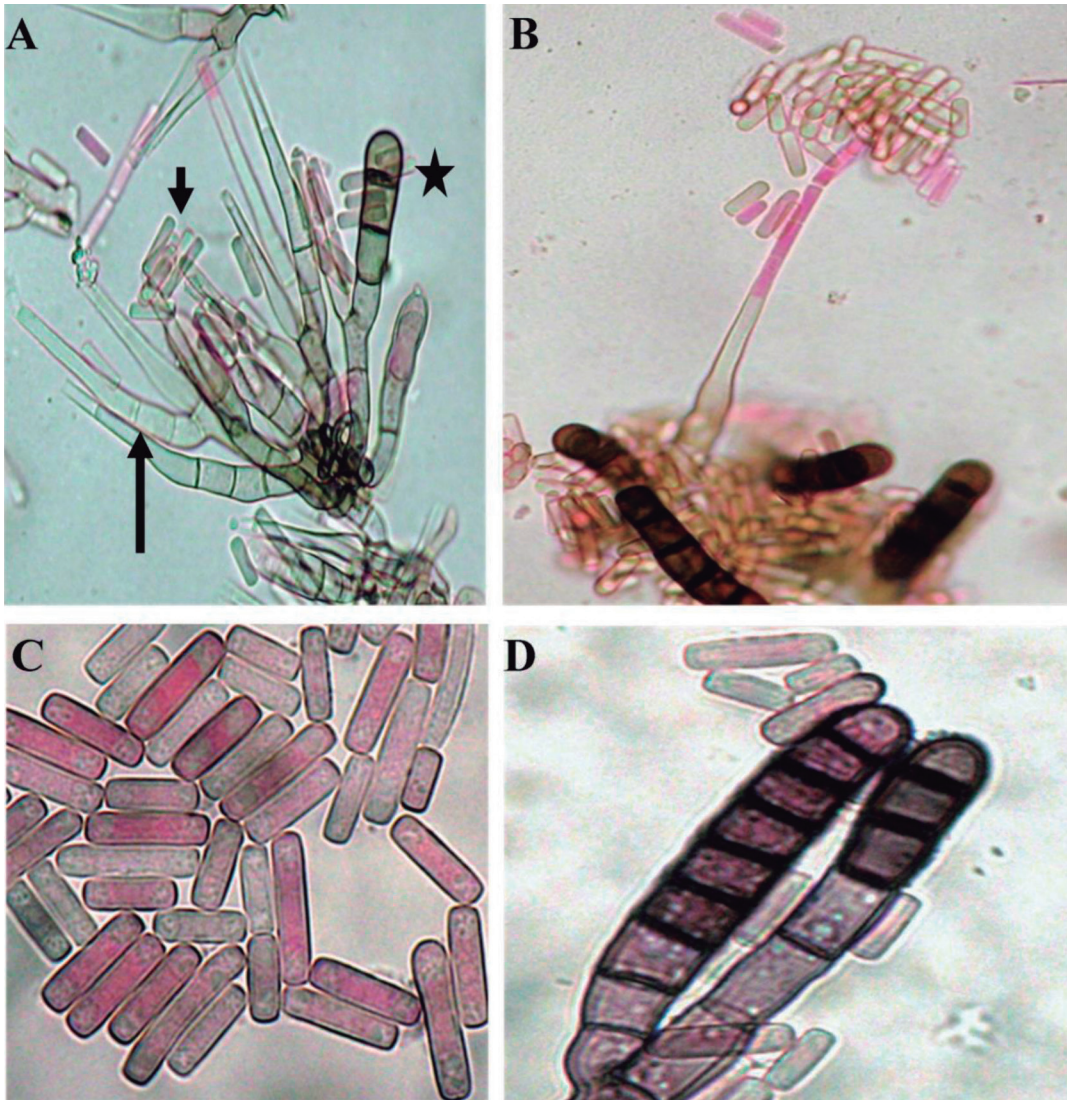

Figura 4: Estructuras reproductivas asexuales de *T. basicola*. A, fialoconidióforos (flecha larga) y fialoconidias rectangulares (flecha corta) conjuntamente con aleuriospora (estrella) en desarrollo; B, fialoconidióforo con fialoconidias acumuladas en la punta y aleuriosporas en la base; C,aproximación de fialoconidias; y D, aproximación de aleurioconidias madura e inmadura, y fialoconidias dispersas.

nado a nivel de secuencia con el primero que con el segundo (figura 5).

Patogenicidad. Las pruebas de inoculación experimental demostraron que *T. basicola* es el agente causal de la podredumbre negra que daña las raíces comestibles de la yuca amarilla en el asentamiento campesino Santo Domingo del Municipio Sucre, Estado Mérida, Venezuela. El hongo desarrolló la enfermedad a los 11 días después de haber sido inoculado en raíces comestibles de yuca amarilla, con y sin heridas, evidenciándose mayor severidad o agresividad en presencia de heridas. El tejido infectado artificialmente presentó inicialmente un manchado de color amarillo-verdoso que,

9 cedeño 2.indd 104 3/1/2017 2:29:39 p. m.

posteriormente, se tornó pardo oscuro. El progreso o avance de la infección presentó forma cónica, aspecto que con regular frecuencia se apreció en las raíces contaminadas naturalmente. En todas las pruebas realizadas las raíces utilizadas como testigos no presentaron cambios aparentes.

Ensayos moleculares. La secuenciación y comparación de la región génica *ITS* del aislado de la yuca reveló su pertenencia inequívoca a *T. basicola* (similitud entre 99.0 y 99.7%, excepto con el aislado de *Pelargonium*, con 98.10 % de similitud en una longitud de 433 nucleótidos). Más aún, se detectaron varios haplotipos: el haplotipo yuca, que difiere del resto de los aislados de la especie por un nucleótido simple (posición 328 de nuestro alineamiento), pero muy emparentado con el haplotipo *Betula*/*Daucus*, más lejanamente con el haplotipo *Lactuca*/*Cichorium* (dos diferencias adicionales, en los nucleótidos 9 y 423), y el haplotipo *Pelargonium*, que difiere de todos los demás por una inserción (entre los nucleótidos 370 y 371 correspondiente al resto de los aislados) y tres cambios de nucleótidos más en las posiciones 430, 431 y 434 (Figura 2). La comparación con distintas especies de *Ceratocystis* y *Thielaviopsis* reveló la existencia de tres clados con fuerte soporte: el clado *C. fimbriata*, y los clados hermanos *C. moniliformis* y *Thielaviopsis* (Figura 5). Dentro de este último, el aislado venezolano de yuca agrupó con otros aislados del anamorfo *T. basicola*, con un fuerte soporte (99%) para la separación del subclado *T. thielavioides*.

T. basicola es cosmopolita, tiene preferencia por los tejidos radicales y causa podredumbre negra en plantas de varias familias (Farr y Rossman, 2013). La presente publicación representa el primer anuncio formal de *T. basicola* como causa de podredumbre negra en raíces comestibles de *M. esculenta*. Desde el punto de vista molecular, el *T. basicola* objeto de investigación, está más emparentado con *C. moniliformis* que con *C. fimbriata*.

En medios artificiales (EMA) y naturales (zanahoria), el hongo produjo dos tipos de conidias, fialoconidias (endoconidias enteroblásticas) y aleuriocoinidias multicelulares. En general, estas estructuras fueron morfológicamente similares a las reportadas por Dalbosco *et al.,* (2004), pero las aleurioconidias resultaron distintas a las publicadas por Carvalho y Carmo (2003).

En la secuenciación de los monoconidiales del *T. basicola* investigado se observó alto grado de coincidencia genética con el clado representativo del viejo mundo, especialmente con los aislados originarios de Sudáfrica (Geldenhuis *et al*., 2006), en los cuales sólo se detectaron dos genotipos con diferencias en dos de los siete loci registrados en la población total evaluada proveniente de maní (*Arachis hypogaea*) y chicoria (*Cichorium intybus*). Utilizando marcadores polimórficos dominantes, Geldenhuis *et al.,* (2006) determinaron que la población sudafricana de *T. basicola* se mostró genéticamente uniforme y, en consecuencia, concluyeron que el hongo fue introducido a Sudáfrica. Cuando su composición genética se comparó con la de aislados obtenidos en distintos países y diferentes hospedadores, Geldenhuis *et al.,* (2006) indicaron que los datos sugerían que eran originarios de Europa.

En lo que respecta al hongo objeto de estudio, la evaluación en detalle de la secuencia genética evidenció que el mismo encaja en el clado del viejo mundo, mostrando alta relación o afinidad con el grupo de aislados sudafricanos. Tomando en consideración la información anterior, se puede proponer la hipótesis de que el *T. basicola* que ataca la yuca en los Andes venezolanos, pudo haber ingresado al país a través de la diseminación intercontinental procedente de Europa, o de África misma. Finalmente, sería interesante analizar más aislados venezolanos de *T. basicola* y aplicar marcadores moleculares co-dominantes (SSR), a fin de determinar si el hongo aquí descrito representa un genotipo particular de la especie con especificidad por su hospedador yuca, particularmen-

9 cedeño 2.indd 105 3/1/2017 2:29:39 p. m.

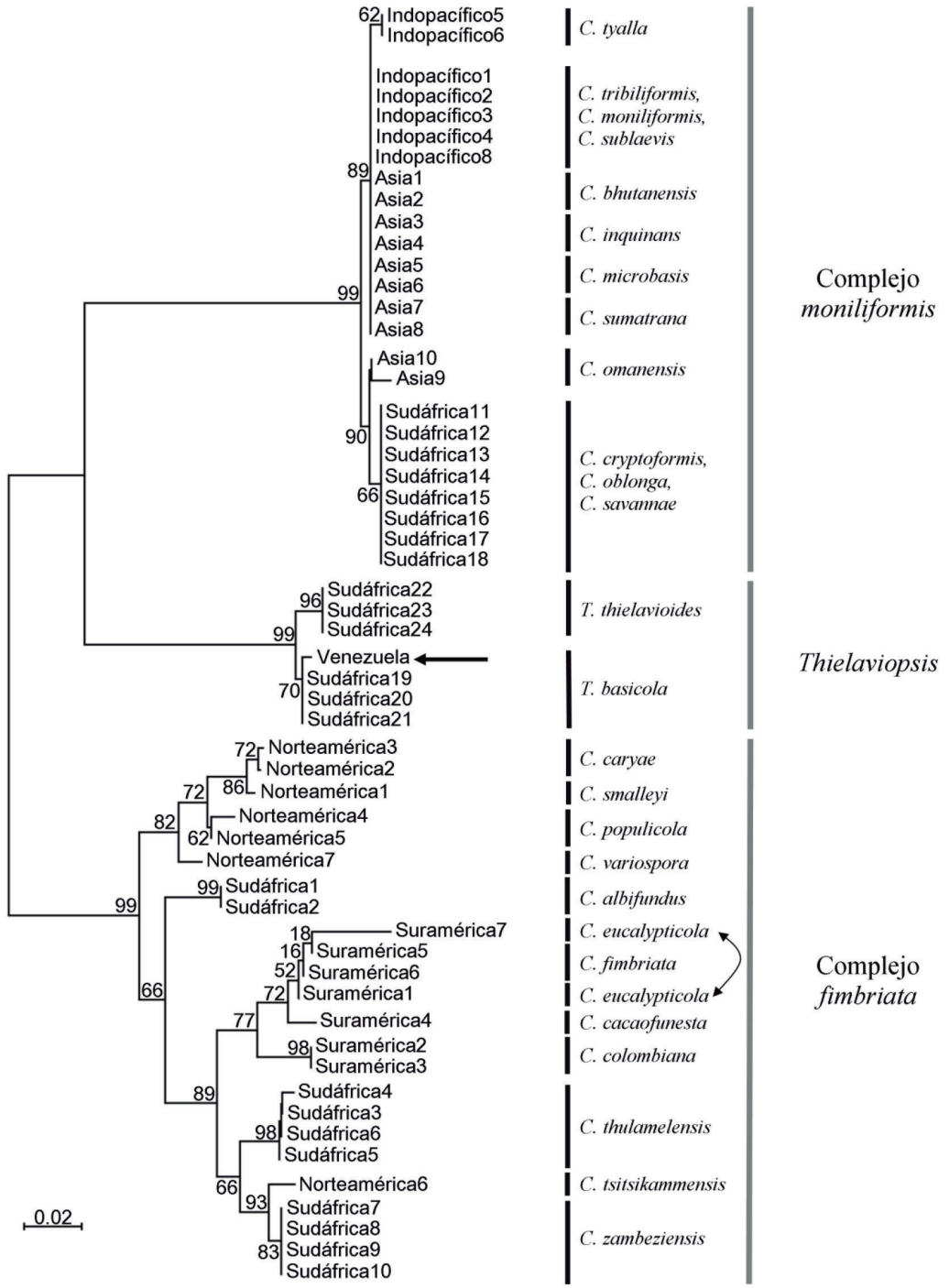

Figura 5: Relaciones de parentesco entre especies del género *Ceratocystis* mediante el análisis por Neighbor Joining de secuencias escogidas (Cuadro 1), incluyendo el aislado de yuca objeto de este estudio. Con la flecha se señala el aislado venezolano, y los valores de cada nodo corresponden a la prueba de robustez empleando 1000 repeticiones.

9 cedeño 2.indd 106 3/1/2017 2:29:39 p. m.

te tomando en consideración que otros estudios han revelado diferencias a nivel de proteoma entre aislados de la especie a partir de distintos hospedadores (Coumans *et al*., 2011).

Finalmente, debe hacerse mención a dos aspectos importantes relacionados con los resultados aquí presentados: primero, que aunque para casos particulares de especies pertenecientes a otras *Ceratocystis* (v. g., *C. fimbriata sensu stricto*) la variación intraespecífica e intragenómica de los marcadores *ITS* tiende a añadir a la confusión imperante en la taxonomía molecular del grupo (Harrington *et al*., 2014), el hongo aquí reportado claramente pertenece a otro clado filogenético muy distinto de éste, y posiblemente originario no del nuevo mundo sino del viejo. Segundo, y no menos importante, es que; taxonómicamente hablando, el estatus de *T. basicola* no puede ser definido sino como "incompleto y temporal" (de Beer *et al*., 2014). De acuerdo a estos autores, *T. basicola* representa un género discreto (de teleomorfo desconocido) que amerita de mayores estudios para su completa tipificación y descripción específica, y para la cual, en aras de no promover más ambigüedad en un fitopatógeno de importancia económica mundial, es preferible, al menos de momento, seguir denominándolo bajo esta designación particular hasta tanto se decida su relación particular con otros miembros de la familia Ceratocystidaceae.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifestamos fehacientemente que valoramos y, en consecuencia, agradecemos al CDCHT-ULA el aporte de los recursos económicos que hicieron posible la ejecución del Proyecto FO-716-12-01-B, el cual dió origen a la investigación cuyos resultados están insertos en este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

Branbury, J.H., 1988. The chemical composition of tropical root crops. *ASEAN Food Journal* 4: 3-13.

Carvalho, A.O., Carmo, M.G.F. 2003. Podridão pós-colheita de cenoura causada por *Ceratocystis fimbriata. Fitopatologia Brasileira* 28:108.

Coumans, J.V.F., Harvey, J., Backhouse, D., Poljak, A., Raftery, M.J, Nehl, D., Katz, M.E. and Pereg, L. 2011. Proteomic assessment of host-associated microevolution in the fungus *Thielaviopsis basicola*. *Environmental Microbiology* 13:576–588.

Dalbosco, M., El Tassa, S.O.M., Duarte, V. 2004. Ocorrência de podridão negra, causada por *Chalara elegans*, em raízes de cenoura no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 29:336.

de Beer, Z.W., Duong, T.A., Barnes, I., Wingfiled, B.D., Wingfield, M.J. 2014. Redifining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology* 79:187–219.

FAOSTAT. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Recurso en línea disponible en http://faostat3.fao.org/home/E.

Farr, D.F., Rossman, A.Y. 2013. Fungal Databases, Systematic Mycology, and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. http://nt.ars-grin.gov./fungaldatabases/ (visitado en Junio 13, 2013).

FEDEAGRO. 2014. Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios. Compendio de estadísticas agropecuarias disponible en http://www.fedeagro.org/detalle5.asp?id=1458.

Geldenhuis, M.M., Roux, J., Cilliers, A.J., Wingfield, B.D., Wingfield, M. J. 2006. Clonality in South African isolates and evidence for European origin of the root pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Mycological Research* 110:306–311.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98.

Harrington, T.C., Kazmi, M., Al-Sadi, A., Ismail, I. 2014. Instraspecific and intragenomic variability of ITS rDNA sequences reveals taxonomic problems in *Ceratocystis fimbriata* sensu stricto. *Mycologia* 106:224–242.

9 cedeño 2.indd 107 3/1/2017 2:29:39 p. m.

Johnson, J.A., Harrington, T.C. y Engelbrecht,, C.J.B. 2005. Phylogeny and taxonomy of North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. *Mycology* 97:1067-1092.

Ma, Z., Michailides, T. 2002. A PCR-based technique for identification of *Fusicoccum* sp. from Pistachio and various other hosts in California. *Plant Disease* 86:515–520.

Moller, J., DeVay, J.E. 1968. Carrots as a species-selective isolation media for *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 58:123–124.

Sambrook, J., Russell, D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 999 pp.

Suarez, L. y Mederos, V. 2011. Apuntes sobre el cultivo de yucca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. *Cultivos Tropicales* 32:27-35

Tamura K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203–14.

9 cedeño 2.indd 108 3/1/2017 2:29:39 p. m.