



“Por un Desarrollo  
Agrario  
Integral y Sostenible”

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**Maestría en Sanidad Vegetal**

**Trabajo de Tesis**

Ocurrencia de *Pythium* sp., y *Phytophthium* sp.,  
en la rizosfera de quequisque [*Xanthosoma*  
*sagittifolium* L. (Schott)] en tres zonas de  
Nicaragua

**Autora**

Ing. Danessa Joseph Ramírez Reynoza

**Asesores**

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Dr. Guillermo Reyes Castro

**Managua, Nicaragua**

**Enero, 2021**



“Por un Desarrollo  
Agrario  
Integral y Sostenible”

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**Maestría en Sanidad Vegetal**

**Trabajo de Tesis**

Ocurrencia de *Pythium* sp., y *Phytophthium* sp.,  
en la rizosfera de quequisque [*Xanthosoma*  
*sagittifolium* L. (Schott)] en tres zonas de  
Nicaragua

**Autora**

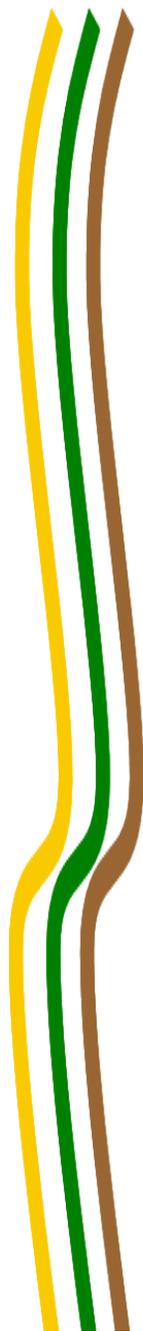
Ing. Danessa Joseph Ramírez Reynoza

**Asesores**

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz  
Dr. Guillermo Reyes Castro

Presentado a la consideración del honorable tribunal  
examinador como requisito final para optar al grado  
de Maestro en Ciencias

**Managua, Nicaragua**  
**Enero, 2021**



## Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

***Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal***

---

Miembros del Tribunal Examinador

---

Presidente (Grado académico y nombre)

Secretario (Grado académico y nombre)

Vocal (Grado académico y nombre)

Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

Este logro se lo dedico a mis abuelos Luis Reynoza Altamirano y Nery Sánchez Chiche por ser el pilar de mi vida

A mí madre Luisa Reynoza Sánchez

Ing. Danessa Joseph Ramírez Reynoza

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradezco muy especialmente a mi asesor Dr. Jorge Ulises Blandón por todo el tiempo que le ha dedicado a este trabajo, por la paciencia que ha tenido y sobre todo por los conocimientos que me ha transmitido. A mi asesor Dr. Guillermo Reyes Castro, por haberme dado la oportunidad de trabajar en esta línea de investigación y haber creído en mí.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA) y al equipo del laboratorio de biología molecular de la Universidad de Costa Rica (UCR), Dr. Luis Gómez Alpizar, Dr. Arturo Brenes e Ing. Fernando Badilla, por todo el apoyo brindado.

Al equipo de trabajo del laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria, MSc. Isaías Sánchez, MSc. Markelyn Rodríguez, MSc. Eliezer Lanuza e Ing. Rudy Cáceres, por ayudarme a consolidar las ideas que surgieron en este estudio y sobre todo por brindarme su amistad.

A mis colegas y amigas MSc. Heeidy Corea y MSc. Rosario García, por siempre haberme brindado sus consejos y estar presente en los obstáculos que se fueron dando durante el desarrollo del presente estudio y ayudarme a encontrar soluciones.

A mis amigos MSc. Ajax Fonseca y MSc. Nelson Degrandes, que durante los años que fuimos compañeros de curso en la maestría en Sanidad Vegetal, siempre me brindaron su apoyo y compartieron sus conocimientos, ayudándome a crecer profesionalmente.

Al MSc. Luis Medina Gómez por estar a mi lado apoyándome incondicionalmente, por alentarme a estudiar y prepararme.

A mi maestra MSc. Yanett Gutiérrez porque me enseñó el amor por la micología vegetal.

Ing. Danessa Joseph Ramírez Reynoza

## INDICE DE CONTENIDO

| SECCIÓN   | PÁGINA     |
|---|------------|
| <b>DEDICATORIA</b>  | <b>i</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTO</b>   | <b>ii</b>  |
| <b>INDICE DE CUADROS</b>  | <b>iii</b> |
| <b>INDICE DE FIGURAS</b>  | <b>iv</b>  |
| <b>INDICE DE ANEXOS</b>   | <b>v</b>   |
| <b>RESUMEN</b>  | <b>vi</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>vii</b> |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>1</b>   |
| <b>II. OBJETIVOS</b>  | <b>3</b>   |
| 2.1 Objetivo general  | 3          |
| 2.2 Objetivos específicos   | 3          |
| <b>III. MARCO DE REFERENCIA</b>   | <b>4</b>   |
| 3.1 El cultivo de quequisque  | 4          |
| 3.1.1 Origen y distribución   | 4          |
| 3.1.2 Taxonomía y nomenclatura  | 4          |
| 3.1.3 Descripción botánica  | 5          |
| 3.1.4 Importancia económica y nutricional                                       | 6          |
| 3.2 Enfermedades del quequisque   | 7          |
| 3.3 Diagnóstico e identificación de <i>Pythium</i> spp y oomicetes relacionados | 7          |
| 3.3.1 Métodos convencionales  | 8          |
| 3.3.2 Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)           | 9          |
| <b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>12</b>  |
| 4.1 Ubicación del estudio   | 12         |
| 4.2 Tipo de estudio   | 12         |
| 4.3 Colecta de muestra  | 12         |
| 4.4 Aislamiento de <i>Pythium</i> sp y otros oomicetes                          | 13         |
| 4.4.1 Aislamiento a partir de suelo   | 13         |
| 4.4.2 Aislamiento a partir de tejido (raíces)                                   | 14         |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.5 Identificación mediante técnica PCR y PCR-RFLP     | 15        |
| 4.5.1 Extracción de ADN                                | 15        |
| 4.5.2 Análisis PCR                                     | 15        |
| 4.5.3 Análisis PCR- RFLP                               | 16        |
| 4.6 Análisis de secuenciación                          | 17        |
| <b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                       | <b>18</b> |
| 5.1 Aislamiento de <i>Pythium</i> sp y otros oomicetes | 18        |
| 5.1.1 Aislamiento a partir del suelo                   | 18        |
| 5.1.2 Aislamiento a partir de tejido (raíces)          | 19        |
| 5.2 Análisis PCR                                       | 19        |
| 5.3 Análisis PCR-RLFP                                  | 22        |
| 5.4 Análisis de secuenciación                          | 24        |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b>                                | <b>28</b> |
| <b>VII. RECOMENDACIONES</b>                            | <b>29</b> |
| <b>VIII. LITERATURA CITADA</b>                         | <b>30</b> |
| <b>IX. ANEXOS</b>                                      | <b>38</b> |

---

## INDICE DE CUADROS

| CUADRO  | PÁGINA |
|---|--------|
| 1. Especies de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthium</i> identificadas a través de secuenciación de las tres zonas de muestreo | 25     |

## INDICE DE FIGURAS

| FIGURA |  | PÁGINA |
|--------|--|--------|
| 1.     | Formación de estructuras de reproducción del género <i>Pythium</i> sp utilizando la metodología de aislamiento con cebos de discos de hoja en medio de cultivo V8 PARB. <b>A</b> Formación de esporangio. <b>B</b> y <b>C</b> Formación de oogonio rodeado por anteridios. | 13     |
| 2.     | Formación de estructuras de reproducción de <i>Pythium</i> sp en medio de cultivo V8 PARB. <b>A</b> Formación de esporangio. <b>B</b> y <b>C</b> Formación de oogonio rodeado por anteridios.  | 18     |
| 3.     | Crecimiento de micelio cenocítico y formación de oogonios en medio agar harina de maíz PAR muestra L6  | 19     |
| 4.     | Electroforesis de producto PCR amplificados con los cebadores Fm58 y Fm66 de aislados de Masaya  | 20     |
| 5.     | Electroforesis del producto PCR amplificados con los cebadores Fm58 y Fm6 de aislados Nueva Guinea   | 21     |
| 6.     | Electroforesis del producto PCR amplificados con los cebadores Fm58 y Fm6 de aislados de San Carlos-RSJ  | 21     |
| 7.     | Electroforesis de digestión con la enzima <i>RsaI</i> , con aislados de Masaya   | 22     |
| 8.     | Electroforesis de digestión con la enzima <i>RsaI</i> , con aislados de San Carlos-RSJ   | 23     |
| 9.     | Electroforesis de digestión con la enzima <i>RsaI</i> , con aislados de Nueva Guinea   | 23     |
| 10.    | Filogenia de especies de <i>Pythium</i> y <i>Phytopythium</i> basada en la región del gen Cox II del ADN mitocondrial  | 26     |

## INDICE DE ANEXOS

| <b>ANEXO</b> |   | <b>PÁGINA</b> |
|--------------|---|---------------|
| 1.           | Posición geográfica de los sitios de recolección de las muestras de suelo y raíces de quequisque en tres zonas de Nicaragua   | 37            |
| 2.           | Posición geográfica de los sitios de recolección de muestras y códigos de aislados por departamento. <b>A</b> Departamento de Masaya. <b>B</b> Departamento de Río San Juan. <b>C</b> Departamento de Región Autónoma Costa Caribe Sur                                | 38            |
| 3.           | Código de muestra, localidad, municipio, departamento y coordenadas de los lugares de colecta de tejido y suelo de los aislados de la rizosfera de quequisque   | 39            |
| 4.           | Colecta de muestras de tejido y suelo del cultivo de quequisque. <b>A</b> Parcela muestreada. <b>B</b> Planta muestreada con síntomas iniciales de mal seco. <b>C</b> y <b>D</b> Muestras de raíces colectadas. <b>E</b> Muestras de suelo trasladadas al laboratorio | 40            |

## RESUMEN

El quequisque [*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.] se encuentra entre los seis cultivos de raíces y tubérculos más importantes del mundo; es originario de la zona tropical de América Central, América del Sur y el Caribe; es una fuente importante de carbohidratos para la nutrición humana y animal; además, se le atribuyen propiedades medicinales. Uno de los principales problemas fitosanitarios a nivel mundial en quequisque es la pudrición radicular causada por el oomicete *Pythium myriotylum*. En Nicaragua también existen reportes de la presencia de esta enfermedad en quequisque, sin embargo, todavía persisten dudas acerca del agente causal de la enfermedad. Por consiguiente, el presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de identificar, mediante herramientas moleculares, especies de *Pythium* y otros oomicetes, que se encuentran en la rizosfera de quequisque con síntomas de pudrición radicular. Se utilizaron dos técnicas para el aislamiento de *Pythium* y otros oomicetes a partir de muestras de suelo y raíces. Los cultivos obtenidos fueron analizados mediante la técnica PCR-RFLP y los productos PCR de ocho aislados fueron secuenciados para determinar su identidad taxonómica. La técnica de cebo con discos de hoja fue la más adecuada para el aislamiento de *Pythium* y otros oomicetes. A través del análisis PCR se determinó que la mayoría de los aislados eran del género *Pythium*, sin embargo, al someterlos al análisis PCR-RFLP utilizando la enzima de restricción *RsaI* ninguno de los aislados presentó los cortes del aislado de referencia que era *Pythium myriotylum* var. *aracearum*. El análisis de secuenciación reveló la ocurrencia de especies de *Pythium* y *Phytopythium* en suelo rizosférico y raíces de quequisque con síntomas de pudrición radicular. En Nicaragua, este es el primer reporte de la ocurrencia de *Phytopythium* en suelo rizosférico y raíces de plantas de quequisque con síntomas de pudrición radicular.

**Palabras claves:** pudrición radicular, oomicetes, secuenciación, PCR-RFLP

## ABSTRACT

Cocoyam [*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.] is among the six most important root and tuber crops in the world; it is native to the tropical zone of Central America, South America and the Caribbean; it is an important source of carbohydrates for human and animal nutrition; in addition, medicinal properties are attributed to it. One of the main phytosanitary problems worldwide in cocoyam is root rot caused by the oomycete *Pythium myriotylum*. In Nicaragua there are also reports of the disease occurrence in cocoyam, however, doubts still persist about the true disease causal agent. Therefore, the present study was carried out with the objective of detecting and identifying, using molecular tools, *Pythium* species and other oomycetes, which are found in the cocoyam rhizosphere with symptoms of root rot. Two techniques were used for the isolation of *Pythium* and other oomycetes from soil and root samples. The cultures obtained were analyzed using the PCR-RFLP technique and the PCR products of eight isolates were sequenced to determine their taxonomic identity. The leaf disc bait technique was the most suitable for the isolation of *Pythium* and other oomycetes. Through the PCR analysis it was determined that most of the isolates were of the genus *Pythium*, however, when subjected to the PCR-RFLP analysis using the restriction enzyme *RsaI*, none of the isolates presented the reference isolate fragments that was *Pythium myriotylum* var. *aracearum*. Sequencing analysis revealed the occurrence of *Pythium* and *Phytophythium* species in cocoyam rhizospheric soil and roots with root rot symptoms. In Nicaragua, this is the first report of the occurrence of *Phytophythium* in rhizospheric soil and roots of cocoyam with symptoms of root rot.

**Key words:** root rot, oomycetes, molecular techniques, sequencing, PCR-RFLP

## I. INTRODUCCIÓN

El quequisque [*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott.] se encuentra entre los seis cultivos de raíces y tubérculos más importantes del mundo (Boakye *et al.*, 2017; FAOSTAT, 2012). Este cultivo es originario de la zona tropical de América Central, América del Sur y el Caribe, donde se ha cultivado y consumido desde la época precolombina y desde donde se extendió a otras partes del mundo (Onyeka, 2014).

El corno, los cormelos y las hojas de la planta de quequisque son una fuente importante de carbohidratos para la nutrición humana, la alimentación animal y la alimentación complementaria. Los cormos son comestibles y generalmente se ingieren cocidos, asados, horneados, al vapor o fritos. En algunos países, además de garantizar la seguridad alimentaria en el mercado interno, también genera ingresos de importación (Obidiegwu *et al.*, 2016).

En Nicaragua, en el ciclo 2019-2020, se registró una producción de quequisque de 275 mil 250 quintales, 3.4% menor al ciclo anterior (2018-2019), que fue de 285 mil quintales y representa el 92% de cumplimiento de la meta del plan de producción, que es de 300 mil quintales. Este rubro se cultiva en pequeñas áreas y la producción se destina principalmente para el consumo local y nacional (www.el19digital.com, 2020). Sin embargo, existen reportes en los cuales se indica que el quequisque también se exporta en Nicaragua (Reyes *et al.*, 2009).

Uno de los principales problemas fitosanitarios que se reporta a nivel mundial en el cultivo de quequisque es la enfermedad conocida como “pudrición radicular” o mal seco causada por el oomicete *Pythium myriotylum* (Pacumbaba *et al.*, 1992; Perneel *et al.*, 2006; Tambong *et al.*, 1999). En Nicaragua también existen reportes de la presencia de esta enfermedad en el cultivo de quequisque (Ramírez-Reynosa y Rodríguez-Zamora, 2012; Sequeira-Orozco y Silva-Mendoza, 2010). Sin embargo, en estos estudios la identificación de las especies de *Pythium* se basaron en características morfológicas y persiste todavía una incertidumbre acerca de la identidad de los aislados de *Pythium* que se identificaron en ese momento.

Tradicionalmente, la detección e identificación de especies de *Pythium* se ha realizado mediante el uso de diferentes medios de cultivo, métodos de cebo o una combinación de ambos (Pettitt *et*

*al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2008). Sin embargo, es difícil, laborioso y requiere mucho tiempo detectar especies de *Pythium* basándose en características morfológicas, en parte porque estas características varían bajo diferentes condiciones de cultivo e involucran variaciones fenotípicas intraespecíficas (Fukuta *et al.*, 2014; Pettitt *et al.*, 2002).

En las últimas dos décadas, el diagnóstico molecular se ha convertido en una estrategia alternativa para la identificación de especies de *Pythium*. Por ejemplo, se han desarrollado métodos de detección basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que involucran marcadores SCAR especie-específicos (Ahonsi *et al.*, 2010), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de PCR (PCR-RFLP) (Gómez-Alpizar *et al.*, 2011; Kageyama *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003) y PCR en tiempo real (Schroeder *et al.*, 2006; Le Floch *et al.*, 2007). El diagnóstico por PCR es más sensible y más rápido que los métodos de cultivo tradicionales.

Recientemente, el análisis de las regiones del ADN ribosomal y ADN mitocondrial mostró que las especies del clado “K” dentro de *Pythium* (Lévesque y de Cock, 2004) pertenecen a un nuevo género denominado *Phytopythium*, el cual muestra características combinadas de *Pythium* y *Phytophthora* (de Cock *et al.*, 2015). Aunque una gran parte de las especies pertenecientes al género *Phytopythium* se consideran organismos saprofitos (agua y suelo), también es posible distinguir entre el grupo patógenos de plantas como *Pp. litorale* (pudrición del fruto de calabaza), *Pp. helicoides* (pudrición de raíces y tallos de muchas plantas) y *Pp. vexans* (pudrición radicular de muchas plantas) (Afandi *et al.*, 2018; Prencipe *et al.*, 2020).

Considerando que el quequisque es un cultivo importante en Nicaragua desde el punto de vista nutricional y económico, se llevó a cabo este estudio con el objetivo de identificar mediante herramientas moleculares, las especies de *Pythium* y otros oomicetes, que se encuentran presentes en la rizosfera de plantas de quequisque con síntomas de la enfermedad conocida como “mal seco”.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Generar información sobre la ocurrencia de *Pythium* spp., y *Phytophthium* spp., en la rizosfera de quequisque [*Xanthosoma sagittifolium* L. (Schott)] mediante la caracterización molecular de aislados recolectados en tres zonas de Nicaragua.

### 2.2 Objetivos específicos

- Comparar procedimientos para el aislamiento de *Pythium* sp., y otros oomicetes a partir de muestras de suelo y de tejido de raíces.
- Identificar *Pythium* sp y otros oomicetes a nivel de género y especie utilizando la técnica PCR y PCR-RFLP.
- Determinar mediante secuenciación las especies de oomicetes presentes en la rizosfera de quequisque.

### III. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 El cultivo de quequisque

El cultivo de quequisque (*Xanthosoma* spp.) pertenece a la familia *Araceae*, la mayoría de estas especies son de origen tropical y subtropical, y son cultivadas como fuente de alimento, aunque algunas especies son utilizadas como plantas ornamentales y medicinales. Los aráceos comestibles se clasifican en dos tribus y cinco géneros: *Lasioideae* (*Cyrtosperma* y *Amorphophallus*) y *Colocasioideae* (*Alocasia*, *Colocasia* y *Xanthosoma*) (Osuji y Nwala, 2014).

##### 3.1.1 Origen y distribución

El origen no está muy claro, aunque la mayoría de las investigaciones sugieren que el quequisque es nativo del Neotrópico, principalmente Centroamérica o el norte de Sudamérica. También se ha sugerido como centro de origen las Indias Occidentales y América del Sur. El género *Xanthosoma* tiene su origen natural en ecosistemas de selva tropical y fuera de su centro de origen, la especie se ha adaptado a lo largo de las orillas de los arroyos. En lugares como Florida, el Caribe y América Central, las principales especies cultivadas de *Xanthosoma* son *X. sagittifolium*, *X. caracu*, *X. atrovirens*, *X. nigrum*, *X. undipes*, *X. brasiliense* y *X. belophyllum* (Manner, 2011).

Las especies del género *Xanthosoma* están catalogadas como invasoras en muchas áreas del mundo (Polinesia Francesa, Florida, las Islas Galápagos, Puerto Rico y Costa Rica) además de haber sido introducidas intencionalmente en varias otras regiones, incluidas África y Asia (Boakye *et al.*, 2018). Aunque el origen de este cultivo es incierto, en general se acepta que es muy versátil en sus requisitos de crecimiento y facilidad de adaptación a nuevas ubicaciones, lo que lo convierte en un cultivo de elección óptima para muchos climas (Vaneker y Slaats, 2013) y una posible alternativa para garantizar la seguridad alimentaria en los países en desarrollo.

##### 3.1.2 Taxonomía y nomenclatura

El cultivo de quequisque se ubica en la División Angiospermae, Clase Liliopsida, Orden Alismatales, Familia Araceae, Subfamilia Aroideae, Tribu Caladieae, Género *Xanthosoma*, Especie *Xanthosoma* spp. En el género *Xanthosoma* se han descrito unas 50-60 especies

(Stevens, 2012), y todas las variedades cultivadas se agrupan actualmente en cuatro especies: *X. sagittifolium*, *X. caracu*, *X. atrovirens* y *X. nigrum* (*X. violaceum*). De estos, los dos más cultivados y económicamente importantes son *X. sagittifolium* y *X. nigrum* (Vaneker y Slaats, 2013). Sin embargo, la clasificación anterior es discutible, ya que algunas especies identificadas no pueden clasificarse en ninguno de los cuatro grupos (Boakye *et al.*, 2018).

Su nombre común varía de un país a otro encontrándose nombres tales como quiscamote (Honduras), tiquizque (Costa Rica), yautía (República Dominicana y Guatemala), otóe (Panamá), okumo (Venezuela), uncucha (Perú), gualuza (Bolivia), malangay (Colombia); queiquexque (México), malanga, guagüí (Cuba) (Milián Jiménez, 2018). En Nicaragua a *X. sagittifolium* se le conoce como quequisque blanco y a *X. nigrum* (*X. violaceum*) se le llama simplemente quequisque.

Por simplicidad, los investigadores se refieren a todos los clones comestibles cultivados de *Xanthosoma* spp., como *X. sagittifolium*, lo que representa un obstáculo para la difusión y el uso preciso de datos científicos sobre el género. La confusión existente sobre su taxonomía y nomenclatura es un gran inconveniente para la utilización de datos científicos disponibles de diferentes áreas indígenas en la búsqueda de aprovechar todo el potencial de *Xanthosoma* spp (Boakye *et al.*, 2018; Ramanatha *et al.*, 2010).

### **3.1.3 Descripción botánica**

La planta del género *Xanthosoma* spp, es una hierba glabra, erecta, de hasta 2 m de altura, acaulescente cuando es joven; las plantas maduras poseen un tallo grueso, erecto y carnoso de hasta 1 m de largo, con numerosas cicatrices foliares y a veces con raíces aéreas. La base de la planta madura es agrandada, ovoide, produciendo tubérculos o bulbos comestibles, subterráneos, laterales y alargados. Las hojas son grandes, de aproximadamente 20 cm de largo, 15 cm de ancho, de forma hastada, con el lóbulo anterior dos veces más grande que el lóbulo posterior, con una vena marginal distinta, los lóbulos basales son redondeados. Las inflorescencias varían de 1 a 3, son axilares, ascendentes; los pedúnculos miden hasta 20 cm de largo; la espata cartácea mide entre 13-15 cm de largo, el tubo 6-7 cm de largo, verde grisáceo, oblongo-ovoide, el limbo elíptico, erecto, cóncavo, adaxialmente crema a blanco, poco acuminado en el ápice; el espádice es ligeramente más corto que la espata; la zona pistilada es

cilíndrica, la zona estaminada es estéril y cónica, rosácea; la zona estaminada es fértil y alargada, elipsoide, de color crema. El fruto una pequeña baya amarilla (Acevedo-Rodríguez y Strong, 2005; Manner, 2011).

### **3.1.4 Importancia económica y nutricional**

Los cormos del quequisque son una excelente fuente de carbohidratos, la mayoría de los cuales son almidón, de los cuales entre el 17% y el 28% es amilasa, y el resto es amilopectina (Matthews, 1998). El almidón del quequisque es uno de los más nutritivos y digestible en un 98.8%, una cualidad atribuida al tamaño de los gránulos que lo hace ideal para personas con dificultades digestivas (Langworthy y Duel, 1992). Las hojas y los pecíolos se utilizan como hortalizas verdes después de la eliminación completa de los elementos ácidos mediante un procesamiento especial. Las hojas contienen niveles significativos de proteínas y también son una excelente fuente de caroteno, potasio, calcio, fósforo, hierro, riboflavina, tiamina, niacina, vitamina A, vitamina C y fibra dietética (Obidiegwu *et al.*, 2016).

El alto contenido de carbohidratos (70%-88% en base seca), principalmente en forma de almidón, no solo imparte propiedades funcionales deseables a los alimentos, sino que también proporciona energía y promueve la saciedad en los consumidores (Owusu-Darko *et al.*, 2014). Por lo tanto, el cormo del quequisque podría considerarse como una alternativa a otras hortalizas con almidón (es decir, batata, ñame o plátano), convirtiéndolo potencialmente en una materia prima de elección para la elaboración de una amplia gama de productos en la industria alimentaria (Coronell-Tovar *et al.*, 2019).

Además de utilizarse como alimento, la planta de quequisque también se ha utilizado tradicionalmente para prevenir y tratar enfermedades óseas, como la osteoporosis (de Oliveira *et al.*, 2012). Algunos reportan también indican que los extractos del cormo poseen una potente actividad captadora de radicales libres (Nishanthini y Mohan, 2012). En otro estudio se hace mención a la actividad quelante y la actividad antitumoral *in vitro*, lo que sugiere que las hojas de la planta de quequisque pueden tener una aplicación práctica en la terapia del cáncer. Por tanto, el quequisque tiene propiedades antiproliferativas frente a las líneas celulares de cáncer humano y se informa que es eficaz para frenar el crecimiento y la propagación del cáncer (Ubalua, 2016).

En Nicaragua, según CETREX (2016), en el período comprendido del año 2006 al año 2015 se exportaron 131 361.4 toneladas métricas de malanga y quequisque con un valor FOB (Free on Board, por sus siglas en inglés) de US\$ 67 322 007.3 y los principales países de destino fueron Estados Unidos, Canadá, Puerto Rico y diferentes países europeos. Desde el año 2015 a la fecha no se encontraron reportes de exportación de quequisque.

### **3.2 Enfermedades del quequisque**

Según Weightman y Moros (1982), el género *Xanthosoma* no es afectado por plagas muy dañinas o enfermedades muy severas. Sin embargo, en algunos lugares del mundo donde crece este cultivo se han reportado dos enfermedades muy importantes. La primera enfermedad es el virus del mosaico de la malanga o Dasheen Mosaic Virus – DsMV, reportado por primera vez infectando a *Colocasia esculenta* (L.) Schott (Zettler *et al.*, 1970), es un potyvirus transmitido por pulgones que infecta una amplia variedad de aráceas cultivadas y plantas ornamentales en todo el mundo (Babu *et al.*, 2011).

La segunda enfermedad más importante en el cultivo de quequisque es la pudrición del rizoma o mal seco, la cual ha sido atribuida al oomicete *Pythium myriotylum* (Perneel *et al.*, 2006; Tambong *et al.*, 1999). Otras enfermedades del quequisque incluyen la mancha bacteriana de la hoja causado por *Xanthomonas campestris* pv *aracearum* y el tizón causado por *X. axonopodis* pv *dieffenbachiae* (Wokocha y Aduo, 2011).

### **3.3 Diagnóstico e identificación de *Pythium* spp y oomicetes relacionados**

Un desafío importante en la ecología microbiana es identificar y detectar rápidamente patógenos responsables de enfermedades específicas de las plantas, incluidas las pudriciones radiculares causadas por *Pythium* spp. Históricamente, la identificación de las especies de *Pythium* se ha basado en la micromorfología y las características de crecimiento en medios específicos. Sin embargo, existe una superposición considerable en las dimensiones y formas de las estructuras microscópicas entre las especies y un alto potencial de errores en la identificación (Tambong *et al.*, 2006).

A medida que se describen nuevas especies de *Pythium*, las limitaciones de las características morfológicas disponibles para encapsular todo el conocimiento actual del género parecen ser

más evidentes. Por lo tanto, se requieren enfoques alternativos para identificar y diferenciar con precisión las especies de este género. Además, existe una clara necesidad de herramientas que permitan una identificación rápida, de alto rendimiento y precisa de patógenos a partir de tejidos sintomáticos o asintomáticos, independientemente de las condiciones ambientales (Martin *et al.*, 2004).

### **3.3.1 Métodos convencionales**

Las especies del género *Pythium* pueden aislarse de raíces infectadas y otras partes de la planta usando medios selectivos que contienen antibióticos antibacterianos tales como rifampicina, ampicilina o penicilina; Rosa de Bengala y pentacloronitrobenceno (PCNB) para retardar el crecimiento de hongos; y pimarcina o benomil para inhibir a los microorganismos que no son oomicetos. El patógeno se puede aislar del suelo utilizando una serie de técnicas de cebo (hojas de gramíneas, semillas de cáñamo, zanahorias, papa) y cuantificar la población utilizando medios selectivos y placas de dilución. Pero la cuantificación de *Pythium* mediante placas de dilución tiene una serie de inconvenientes y limitaciones. Es posible que las placas de dilución no detecten con precisión poblaciones de suelo por debajo de 10 a 50 propágulos por gramo de suelo a menos que el número de placas replicadas por muestra sea lo suficientemente alto. Sin embargo, la limitación más importante es que no todas las especies se pueden distinguir en las placas según su morfología, por lo que se deben subcultivar e identificar diferentes tipos de colonias, lo que requiere mucho tiempo y es muy laborioso. Puede llevar de 2 a 3 semanas una identificación precisa de todas las especies que se pueden observar en una placa de dilución del suelo (Schroeder *et al.*, 2013).

Las técnicas de cebo se han utilizado desde la década de 1960 para la detección de *Phytophthora* y *Pythium* en el agua y en el suelo (Werres *et al.*, 2014), y pueden ser muy efectivas, aunque de sensibilidad variable, ya que dependen de la calidad y el estado fisiológico de los tejidos vegetales que se utilizan como cebos (Themann *et al.*, 2002; Hüberli *et al.*, 2000).

Independientemente de las limitaciones que tienen los métodos convencionales, éstos se han utilizado para el aislamiento e identificación de las especies de *Pythium* en diversos cultivos. Por ejemplo, en un estudio realizado por Weiland (2011) en el que uno de los objetivos era comparar tres métodos de aislamiento para evaluar la riqueza y abundancia de especies de

*Pythium*, encontró que el método de la placa de dilución tuvo varias ventajas sobre el método de cebo para evaluar las especies de *Pythium* en suelos de viveros forestales. Primero, el método de la placa de dilución permitió una fácil cuantificación de propágulos de *Pythium* por gramo de suelo. En segundo lugar, las placas de dilución fueron el único método que distinguió entre los tres viveros evaluados según la frecuencia de aislamiento de *Pythium*. En tercer lugar, las placas de dilución permitieron sistemáticamente la detección de todas las especies aisladas con mayor frecuencia (es decir, se observaron más de 10 aislados de una especie).

En otras investigaciones se reporta que las zoosporas de *P. ultimum* var *sporangiferum* mostraron mayor preferencia por los cebos de semillas de cáñamo que por los cebos de discos de hojas de rododendro (Pettitt *et al.*, 2002). Asimismo, Pittis y Colhoun (1984) también informaron de la colonización preferencial de cebos de plantas por varias especies de *Pythium*, pero detectaron más fácilmente varias especies colocando directamente muestras de agua en un medio semiselectivo. Dado que ambos tipos de análisis se siguen utilizando para evaluar la diversidad de especies de *Pythium* (Broders *et al.*, 2009; Linde *et al.*, 1994; Paulitz y Adams, 2003), es fundamental comprender de una mejor manera cómo cada uno de esos métodos influye en la detección de poblaciones y comunidades de *Pythium*.

### **3.3.2 Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La taxonomía basada en la morfología se complementa cada vez más con las características moleculares de una especie determinada (Paul, 2003). La identificación de especies de *Pythium* a través de métodos moleculares como el análisis de la secuencia de ADN es muy útil y puede proporcionar nuevas pruebas y reavivar el interés por dividir el género *Pythium* (Ho *et al.*, 2012).

El género *Pythium* con 355 especies descritas, ha sido notoriamente difícil por su taxonomía. Históricamente, también ha habido una gran confusión con respecto a la validez de *Pythium* como un género distinto. Se han hecho intentos de dividir el género *Pythium* en dos géneros para diferenciar las especies con esporangios esféricos de aquellas con esporangios filamentosos. Sin embargo, estudios filogenéticos recientes basados en datos moleculares han proporcionado nueva evidencia que puede conducir a la división del género *Pythium* (Ho, 2018). Por ejemplo, Bala *et al.*, (2010) propusieron un nuevo género *Phytopythium* para aquellas especies con esporangios de globosos a ovoides, a menudo papilados y de proliferación interna.

En otro estudio llevado a cabo por Uzuhashi *et al.*, (2010), restringieron el género *Pythium* a aquellas especies con esporangios filamentosos inflados o no inflados mientras crearon cuatro nuevos géneros para acomodar especies con esporangios no filamentosos: *Ovatisporangium* para especies con esporangios principalmente de ovoide a piriforme, a veces de forma irregular; *Elongiosporangium* para especies con esporangios con forma de clava o elongados; *Globisporangium* para especies con esporangios globosos, a veces proliferantes; y *Pilasporangium* para especies con esporangios globosos no proliferantes.

Basado en análisis filogenético molecular, de Cock *et al.*, (2015), agruparon las especies de *Pythium* en 14 clados identificados con letras de la A hasta la K. Todas las especies del clado K, incluyendo *Py. boreale* Duan, *Py. chamaehyphon* Sideris, *Py. cucurbitacearum* Takimoto, *Py. helicoides* Drechsler, *Py. indigoferae* Butler, *Py. oedochilum* Drechsler y *Py. vexans* de Bary fueron reclasificadas como especies de *Phytopythium* (Bala *et al.*, 2010), que es morfológicamente intermedio entre *Phytophthora* y *Pythium*, y tratada como sinónimo de *Ovatisporangium* (Ho, 2018).

A fin de contextualizar la génesis del género *Phytopythium*, éste es un género relativamente joven que se distingue del género *Pythium* (Bala *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2020). Este género está fuertemente asociado con ambiente de agua dulce, donde se pueden encontrar muchos de sus representantes (Nam y Choi, 2019; Redekar *et al.*, 2019). Algunas de las especies de *Phytopythium* son patógenos de plantas que se desarrollan en hábitats húmedos, por ejemplo, *Pp. helicoides*, que se propaga a través del agua, se desarrolla en el suelo e infecta las raíces de las plantas. Estos organismos se consideran particularmente importantes en la producción agrícola (Baten *et al.*, 2014). Hasta la fecha, se han descrito más de 20 especies, incluida *Pp. sindhum*, *Pp. helicoides* o *Pp. citrinum*.

Existen varios reportes sobre los efectos nocivos de las especies del género *Phytopythium* no solo en plantas agrícolas sino también en árboles y arbustos (Jung *et al.*, 2020; Tkaczyk, 2020). En una investigación realizada en Brazil para analizar las causas de la pudrición blanda de las raíces de yuca (*Manihot esculenta*), considerada la mayor amenaza para este cultivo en Brazil, encontraron que *Phytopythium* era uno de los principales agentes causales de la enfermedad (Boari *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019).

Las características morfológicas comunes del género *Phytopythium* son esporangios ovoides a globosos con papilas (a excepción de *Pp. vexans*), proliferación interna común similar a la de *Phytophthora* y modo de descarga de zoosporas similar a la de *Pythium*. El esporangio forma un tubo de descarga con una vesícula en la punta. El protoplasma indiferenciado se mueve a través del tubo hasta la vesícula, y a esto le sigue la diferenciación en zoosporas biflageladas. La mayoría de las especies tienen oogonios grandes y lisos, oosporas de paredes gruesas y una o dos células anteridiales paraginosas alargadas que están unidas lateralmente al oogonio. La temperatura óptima de crecimiento para las especies de este género es 30°C y la temperatura máxima oscila entre 35°C y 40°C (Baten *et al.*, 2014; Lévesque y de Cock 2004).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km 12 ½ carretera norte Managua, Nicaragua y en el Laboratorio de Biotecnología de las Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (UCR), ubicada de la UNED, carretera a Sabanilla, 200 m este y 75 m sur San Pedro de Montes de Oca 2060, San José, Costa Rica.

### 4.2 Tipo de estudio

El estudio consistió en una investigación cualitativa porque los resultados fueron obtenidos y descritos basados en la interpretación de los datos de la comparación de diferentes metodologías para el aislamiento de *Pythium* y otros oomicetes, la identificación molecular a través de las técnicas PCR y PCR-FRLP y análisis de secuenciación de las especies aisladas en la rizosfera de quequisque (Hernández Sampieri *et al.*, 2010).

### 4.3 Colecta de muestra

Las muestras de suelo y tejido se colectaron en parcelas con establecimiento del cultivo de quequisque que tenían antecedentes o presentaban síntomas de mal seco, en tres zonas de Nicaragua: Masaya, Nueva Guinea (Región Autónoma de la Costa Caribe Sur - RACCS) y San Carlos (Río San Juan - RSJ) (Anexo 1).

Los sitios de muestreo fueron georreferenciados con un geoposicionador satelital (GPS) (Anexo 2 y 3). Las muestras de suelo se colectaron utilizando la metodología de Almaraz-Sánchez *et al.*, (2013), que consistió en tomar en cada parcela cinco muestras, a una profundidad de 5 a 15 cm, se empacaron en bolsas de polietileno. Luego se procedió a colectar muestras de tejido de plantas que presentaron síntomas de la enfermedad mal seco y plantas aparentemente sanas, todas las muestras fueron debidamente etiquetadas y trasladadas al Laboratorio de Microbiología de la UNA (Anexo 4).

#### **4.4 Aislamiento de *Pythium* sp y otros oomicetes**

Para el aislamiento de oomicetes se utilizaron dos metodologías: aislamiento por captura con cebos de discos de hojas en muestras de suelo y aislamiento a partir de raíces con síntomas de mal seco.

##### **4.4.1 Aislamiento a partir de suelo**

Se utilizó la metodología de Pacumbaba *et al.*, (1992) que consistió en que las muestras de tierra colectadas fueron homogenizadas y se pesaron 30 g de suelo que se colocaron en recipientes plásticos con capacidad de 400 ml, se le adicionaron 125 ml de agua destilada estéril. Los desechos flotantes se removieron limpiando la superficie varias veces con trozos pequeños de papel filtro esterilizado y se colocaron cebos de discos de hojas sanas de quequisque, el tamaño de los discos fue de 6 mm de diámetro, hechos con una perforadora de papel, fueron secados en horno y esterilizados con luz ultravioleta. Los cebos se colocaron en recipientes plásticos que contenían el agua con el suelo y se incubaron a una temperatura de 28°C por 72 horas.

Los cebos se retiraron de los recipientes con una pinza estéril, se secaron en papel filtro esterilizado y se depositaron en placas Petri con el medio de cultivo V8 PARB [jugo V8 (100 ml L<sup>-1</sup>), carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub> 1.5g L<sup>-1</sup>), β-sitosterol (0.05 g L<sup>-1</sup>), agar-agar (20g L<sup>-1</sup>), agua destilada (900ml)]. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y cuando se enfrió a 40°C se añadieron los antibióticos (PARB) pimaricina (0.01 g L<sup>-1</sup>), ampicilina (0.250 g L<sup>-1</sup>), rifampicina (0.01 g L<sup>-1</sup>) y el fungicida benomil (0.01 g L<sup>-1</sup>) para minimizar el crecimiento de microorganismos contaminantes (Binagwa *et al.*, 2016; Gómez-Alpízar *et al.*, 2011). (Figura 1)

Las placas Petri se incubaron a 28°C durante 3 días y se monitorearon hasta observar crecimiento micelial.



Figura 1. Método de captura por cebos con discos de hojas de quequesque para el aislamiento de *Pythium* sp y otros oomicetes. **A** Suelo con agua destilada estéril con los cebos de discos de hojas. **B** y **C** Proceso de incubación de los cebos a 28°C. **D** Siembra de los cebos en medio de cultivo V8 PARB.

#### 4.4.2 Aislamiento a partir de tejido (raíces)

Las raíces de quequesque fueron lavadas con abundante agua para retirar restos de suelo. Las que presentaron manchas necróticas fueron cortadas en trozos con un tamaño aproximado de tres a cuatro centímetros, estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 1% (NaOCl) durante dos o tres minutos y luego fueron secadas en papel filtro esterilizado (Tambong *et al.*, 1999).

Los cortes de raíces fueron sembrados en los medios de cultivo: V8 PARB (descrito anteriormente), medio agar-agar al 1.5 % suplementado con 300 mg L<sup>-1</sup> de estreptomicina usado por Perneel *et al.*, (2006) y agar harina de maíz PAR, el medio base contenía 17 g L<sup>-1</sup> de agar harina de maíz, al cual se le añadieron los antibióticos pimarcina (0.01 g L<sup>-1</sup>), ampicilina (0.250 g L<sup>-1</sup>) y rifampicina (0.01 g L<sup>-1</sup>) (Molina-Gayosso *et al.*, 2016).

Los medios bases fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos y cuando se enfriaron a 40°C se añadieron los antibióticos anteriormente descritos. Posteriormente los trozos de raíces fueron colocados en los platos Petri que contenían los medios de cultivo, se incubaron a una temperatura de 28°C en oscuridad y se observaron diariamente hasta observar crecimiento micelial.

## **4.5 Identificación mediante técnica PCR y PCR-RFLP**

Para realizar la extracción de ADN y la identificación de los aislados mediante la aplicación de las técnicas PCR y PCR-RFLP, se seleccionaron los aislados que presentaron características morfológicas típicas del género *Pythium* descritas por Van der Plaats-Niterink, (1981), que consiste en la observación de micelio cenocítico, esporangios, formación de oogonios y anteridios. Fueron un total de 31 aislados: 14 Masaya, 11 de Nueva Guinea-RACCS y seis de San Carlos-RSJ.

El ADN del control positivo utilizado en este estudio correspondió a la especie *Pythium myriotylum* var *aracearum* procedente del Laboratorio de Biotecnología de las Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (UCR).

### **4.5.1 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se utilizó la metodología propuesta por Doyle y Doyle, (1990), con modificaciones, que consistieron en calentar el buffer de extracción CTAB por 30 minutos a 65°C. Se colocó 100 mg de micelio fresco en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se le adicionaron 500 µl de CTAB (buffer). Se maceró el micelio y se incubó a 65°C por 30 minutos. Posterior a la incubación, se adicionaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregó nuevamente cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 5 minutos a 14 000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml, y se adicionó 350 µl de isopropanol, se incubó por 15 minutos a -20°C, se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Al pellet resultante se le adicionó 100 µl de etanol mezclando por inversión, se centrifugó a 14 000 rpm por 4 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, el pellet fue re suspendido en 100 µl de agua calidad molecular, se adicionó 1µl de la ribonucleasa ARN-asa y se incubaron por 20 minutos a 37°C. El ADN extraído se mantuvo a una temperatura de -20°C hasta su uso.

### **4.5.2 Análisis PCR**

La región del gen Cox II del ADN mitocondrial, se amplificó a 563 pb usando los cebadores Fm66 delantero 5'-TAGGATTTCAAGATCCTGC-3' y Fm58 reverso 5'-CCACAAATTTCACTACATTGA-3' (Martin, 2000; Villa *et al.*, 2006). Se utilizó por cada

reacción de PCR 10.55 µl de agua nanopura estéril, 2.5 µl de DreamTaq Buffer (10X), 1.7 µl de MgCl (25mM), 2 µl de dNTPs (2mM), 2 µl del primer Fm 58, 2 µl del primer Fm66, 1 µl de BovineSerumAlbumin (BSA)(2mg/mL), 0.25 de DreamTaqpol (5U/ µl) y 3 µl de ADN. Las amplificaciones se realizaron con el termociclador marca Veriti (96 WellThermalCycler), programado para la desnaturalización inicial a 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización 94°C durante 1 minuto, 52°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR obtenidos se procesaron con geles de agarosa al 1.6% disuelto en un buffer TBE a una concentración de 0.5 X, la visualización se logró tiñendo el producto PCR (5 µl), con 1 µl de colorante de carga, y se usó como escalera 2.5 µl de gene ruler 100 pb plus. La electroforesis tuvo una duración de 1 hora a 80 voltios. Los productos amplificados se visualizaron y se fotografiaron en el transiluminador UVIDoc con el programa UBIDoc 1D

#### **4.5.3 Análisis PCR- RFLP**

La identificación molecular de *Pythium* a nivel especie presente en la rizosfera de quequisque se realizó mediante la técnica PCR-RFLP. Esta consistió en usar el producto de la amplificación de la PCR con los cebadores reverso Fm58 y delantero Fm66. El producto de la PCR se sometió a digestión con la enzima *RsaI* GT↓AC (Alfaro-Araya, 2012) en un volumen final de 10 µl. El procedimiento consistió en adicionar 8 µl de producto amplificado PCR, 0.5 µl de la enzima de restricción, 0.5 µl de buffer tango 10X y 1 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente se incubó a 37°C por una hora. Las amplificaciones se realizaron con el termociclador marca Veriti (96 WellThermalCycler), programado para realizar la digestión de la enzima con 3 ciclos de 37°C por 65 minutos y un ciclo de 65°C por 20 minutos. Después se procedió a realizar la separación de los fragmentos en un gel de agarosa al 4% (w/v) en solución de Tris-Borato-EDTA (TBE) buffer 5 X. El control positivo que se utilizó para comparar los aislamientos de las diferentes zonas correspondió a la especie *Pythium myriotylum* var *aracearum*, el cual presentó cuatro patrones de bandas en la electroforesis: 50 pb, 100 pb, 150 pb y 200 pb.

De los resultados de la PCR-FRLP, para realizar el análisis de secuenciación se escogieron ocho aislados que resultaron ser diferentes a los cortes de bandas del control positivo. Se tomó en consideración escoger por zona dos a tres aislados que presentaran patrones de cortes de bandas

iguales. De la zona de Masaya se tomaron tres aislados: M1, L6 y N14; Nueva Guinea fueron tres aislados: 38, 44 y 46 y San Carlos fueron dos aislados: 29 y 34.

#### **4.6 Análisis de secuenciación**

Se realizó un PCR a las muestras utilizando los cebadores específicos para oomicetes ITS100 (5`-GGAAGGATCATTACCACAC-3`) y el cebador universal ITS4 (5`TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`) (Riit *et al.*, 2016). Se utilizó por cada reacción de PCR 8.55µl de agua nanopura estéril, 2.5µl de DreamTaq Buffer (10X), 1.7µl de MgCl (25mM), 2µl de dNTPs (2mM), 2µl del primer ITS100, 2µl del primer ITS4, 1µl de Bovine Serum Albumin (BSA)(2mg/mL), 0.25 de DreamTaqpol (5U/µl) y 5µl de ADN. Las amplificaciones se realizaron con el termociclador marca Veriti (96 WellThermalCycler), estableciendo el siguiente programa térmico: 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 45 segundos a 72°C y un ciclo final de 5 minutos a 74°C. Los productos PCR obtenidos se enviaron a secuenciar por medio de la Empresa MACROGEN. Posteriormente las secuencias genómicas del ADN se analizaron con el programa BLAST que se encuentra disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Luego las secuencias se obtuvieron de la base de datos y se alinearon con el programa CLUSTAL-W, y finalmente el árbol filogenético fue construido con el software MEGA 10. (Degrandes-Rodríguez, 2018; Kumar *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 1994).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamiento de *Pythium* sp y otros oomicetes

#### 5.1.1 Aislamiento a partir del suelo

La metodología de aislamiento de cebos con discos de hoja en suelo en medio V8 PARB, presentó menos contaminación en los platos Petri, hubo mayor crecimiento micelial y se logró observar algunas características micro morfológicas como abundantes oogonios con anteridios y esporangios (Figura 2). Se aislaron 30 cepas de *Pythium* sp que correspondieron a los siguientes códigos de muestra: M1, M2, M3, M4, L5, L6, L7, L8, L9, N14, J15, J16, J18, J19, 37, 38, 41, 44, 45, 46, 47, N34, N35, N40, N33, 29, 31, 32, 34, 35.

Estudio realizado por González-Moya, (2019) concluyó que el método de aislamiento de *Pythium myriotylum* usando hojas de quequisque como cebo sembradas en medio V8 PARB tuvo mayores probabilidades de aislamiento comparado con los métodos de aislamiento a través de tejido (raíces) y dilución seriada en suelo. La técnica del cebo fue utilizada por Pacumbaba *et al.*, (1992), para aislar *Pythium myriotylum*, de raíces que presentaban pudrición se aisló *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, con el objetivo de encontrar el agente causal de la enfermedad mal seco en el cultivo de quequisque, concluyendo que *P. myriotylum* era el agente primario de la enfermedad. Además, esta técnica es muy útil para el aislamiento de otras especies de oomicetes. Por ejemplo, se puede mencionar que Almaraz-Sánchez *et al.*, (2013) usó exitosamente cebos de hojas de camelia y azalea para aislar especies de *Phytophthora*, al igual que Díaz-Zelaya *et al.*, (2011) utilizó hojas completas o discos de azalea para aislar especies de *Pythium* de la rizosfera de plantas ornamentales.

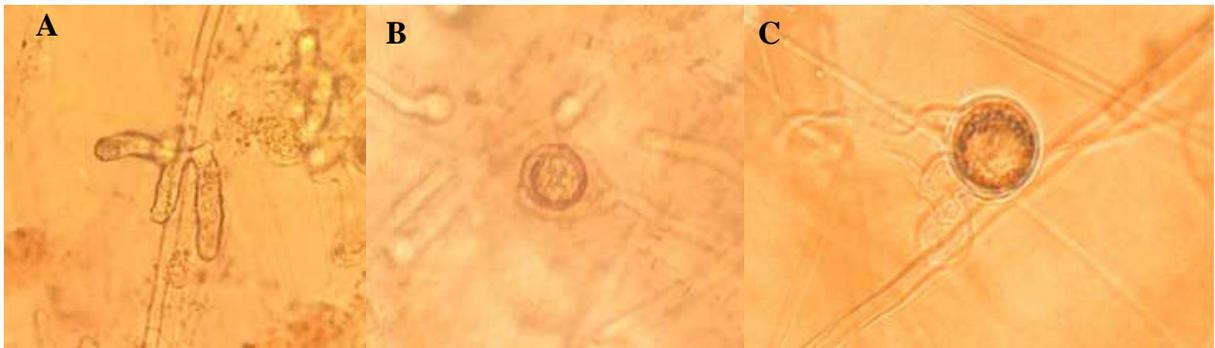


Figura 2. Formación de estructuras de reproducción del género *Pythium* sp utilizando la metodología de aislamiento con cebos de discos de hoja en medio de cultivo V8 PARB. **A** Formación de esporangio. **B** y **C** Formación de oogonio rodeado por anteridios.

### 5.1.2 Aislamiento a partir de tejido (raíces)

En el método de aislamiento a partir de raíces en los diferentes medios de cultivo (V8 PARB, agar-agar más estreptomina y agar harina de maíz PAR), se observó mayor contaminación por bacterias dificultando el crecimiento micelial del género *Pythium*. Se logró obtener solo un aislado en el medio agar harina de maíz PAR correspondiente al código de muestra L6. (Figura 3)

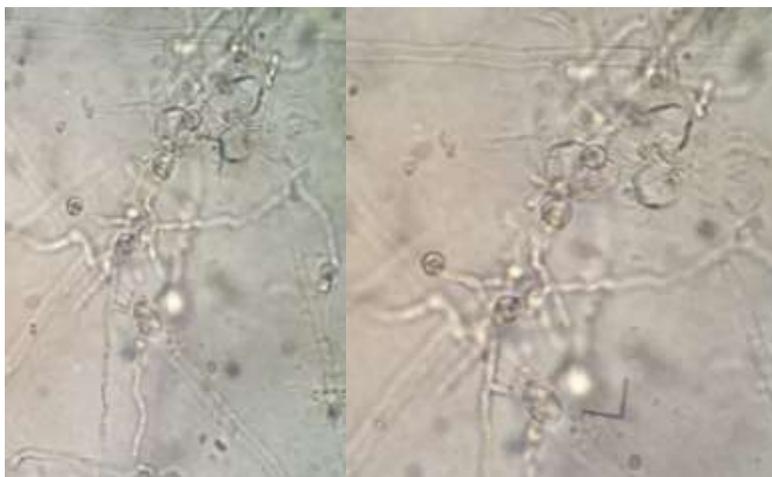


Figura 3. Crecimiento de micelio cenocítico y formación de oogonios en medio agar harina de maíz PAR muestra L6.

En este estudio no se logró aislar especies de *Pythium* exitosamente a partir de tejido enfermo (raíces). Sin embargo, en un estudio realizado por Díaz-Celaya *et al.*, (2011) en el cual el objetivo era detectar e identificar especies de *Pythium* de tejido de raíces y de la rizosfera de suelo, lograron aislar 18 especies de *Pythium* en medio V8 con antibióticos. Además Fernández-Cruz, (2019), identificó *Pythium myriotylum* var. *aracearum*, agente causal de la enfermedad mal seco, aislando el patógeno usando la metodología de siembra de tejido enfermo (raíces) en medio agar harina de maíz con antibiótico (PARC). En investigaciones realizadas por Tambong *et al.*, (1999), Perneel *et al.*, (2006) y Gómez-Alpízar *et al.*, (2011), obtuvieron los aislados *Pythium* sp para sus estudios a partir de raíces en medio agar agua con estreptomina.

## 5.2 Análisis PCR

El análisis PCR se realizó a los 31 aislados obtenidos de las diferentes zonas de muestreo, la electroforesis se hizo a partir de la amplificación de la región Cox II del ADN mitocondrial cortados por los cebadores Fm58 delantero y Fm66 reverso.

El producto de la electroforesis de los 14 aislados del Departamento de Masaya, fueron amplificados con los cebadores observando fragmentos que se aproximaban a los 600 pb, siendo similares al control positivo. Nueve presentaron patrones de bandas fuertes (L5, L6, L7, L8, N14, J15, J16, J17 Y J19), y cinco mostraron patrones de bandas tenues (M1, M2, M3, M4 y L9), indicando que los aislados pertenecen al género *Pythium* (Figura 4).

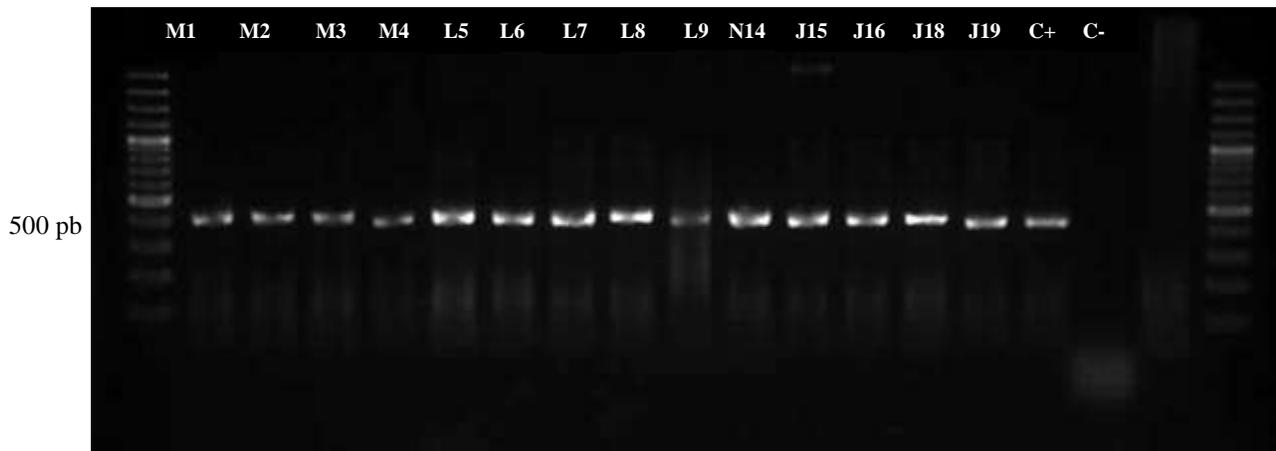


Figura 4. Electroforesis de producto PCR amplificados con los cebadores Fm58 y Fm66 de aislados de Masaya

Estos cebadores han sido utilizados para estudios sobre filogenética dentro del género *Pythium*. Martin (2000) usó estos cebadores en el gen del citocromo oxidasa II para evaluar las relaciones filogenéticas de 67 aislamientos que representaban 24 especies de *Pythium*, obteniendo como resultado la ubicación de las especies evaluadas en tres clados diferentes, ubicando los aislados generalmente por su morfología. En el clado I estaban las especies que generan zoosporangios globosos a esféricos o hifas esféricas, en el clado II se observó que las especies producían hifas hinchadas, esféricas y en el clado III se ubicaron las especies con zoosporangios filamentosos a lobulados.

De los 11 aislados del municipio de Nueva Guinea, en la electroforesis cuatro aislados no amplificaron (41, 44, 45 y 47) y siete amplificaron. De los siete aislados que amplificaron cuatro presentaron patrones de bandas fuertes que correspondían a las muestras N34, N35, N40 y N33 y tres aislados presentaron bandas tenues (37, 38 y 46), todas con fragmentos de aproximadamente 600 pb, siendo similares al control positivo. Esto indicó que los aislados donde las bandas amplificaron correspondían al género *Pythium* (Figura 5). De los seis aislados

de San Carlos-RSJ, cinco presentaron patrones de bandas tenue, con fragmentos aproximados a 600 pb, correspondientes a los códigos 29, 32, 34, 35 y 36. Solamente la muestra 31, no amplificó en la electroforesis con los cebadores mitocondriales. Los aislados que presentaron amplificación en los patrones de bandas correspondían al género *Pythium* ya que fueron similar al control positivo (Figura 6).

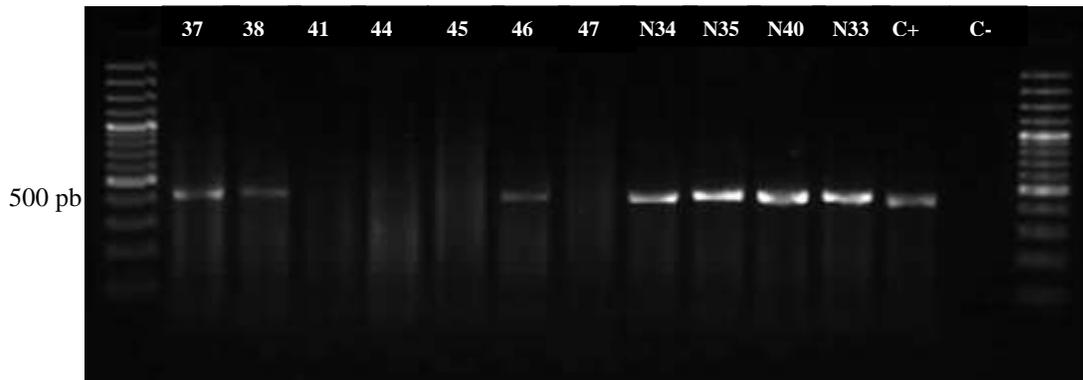


Figura 5. Electroforesis de producto PCR amplificados con los cebadores Fm58 y Fm66 de aislados de Nueva Guinea

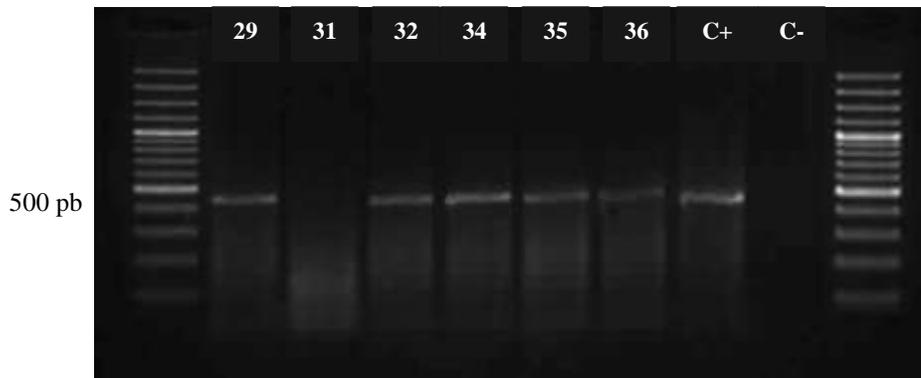


Figura 6. Electroforesis de producto PCR amplificados con los cebadores Fm58 y Fm66 de aislados de San Carlos-RSJ

Para la identificación molecular de las especies de *Pythium* también se ha utilizado la región ITS (espaciador transcrito interno). En un estudio de Diaz-Zelaya *et al.*, (2011), identificaron mediante técnicas moleculares PCR y secuenciación, las especies de *Pythium* sp asociadas a plantas ornamentales, usando las secuencias de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADNr, identificando 7 especies de *Pythium*: *P. aphanidermatum*, *P. irregulare*, *P. cylindrosporum*, *P. dissotocum*, *P. ultimum var. ultimum*, *P. splendens* y *Pythium* sp.

### 5.3 Análisis PCR-RLFP

Los patrones de bandas de restricción de los productos PCR, se observaron mediante la amplificación con los cebadores mitocondriales Fm58 y Fm66, que se sometieron a digestión con la enzima de restricción *RsaI*. Se observaron diferentes cortes de fragmentos de bandas de los aislados incluyendo el control positivo de las tres zonas (Figura 7, 8 y 9). El control positivo presentó cuatro patrones de bandas: 50 pb, 100 pb, 150 pb y 200 pb.

En las muestras de Masaya donde se observaron cinco cortes de bandas con distintos pares de base, indicando que hubo digestión de la enzima de restricción, pero ninguna fue similar al control positivo. Los cortes de banda que predominaron fueron los de 200 pb/300 pb, que correspondían a diez de los aislados (M1, M2, M4, L5, L6, L7, L8, L9, N14 y J15). Dos muestras presentaron cortes de banda de 600 pb, 300 pb, 200 pb y 150 pb (J17 y J19). Una presentó cortes de banda de 600 pb, 200 pb y 150 pb (aislado M3). En el aislado J16 se observó cortes de 200 pb y 150 pb (Figura 7).

Los aislados de Nueva Guinea y San Carlos coinciden en cortes de bandas de 500 pb en las muestras: 37, 46, N34, N35, N40, N33, 32, 34, 35 y 36 (Figuras 8 y 9). Los aislados 31, 41, 44, 45 y 47 no presentaron digestión con la enzima de restricción (Figura 9). Ninguno de los 31 aislados fueron similar al corte de bandas del control positivo, determinado que no corresponden al patógeno *Pythium myriotylum* var *aracearum* agente causal de la enfermedad mal seco del quequisque.

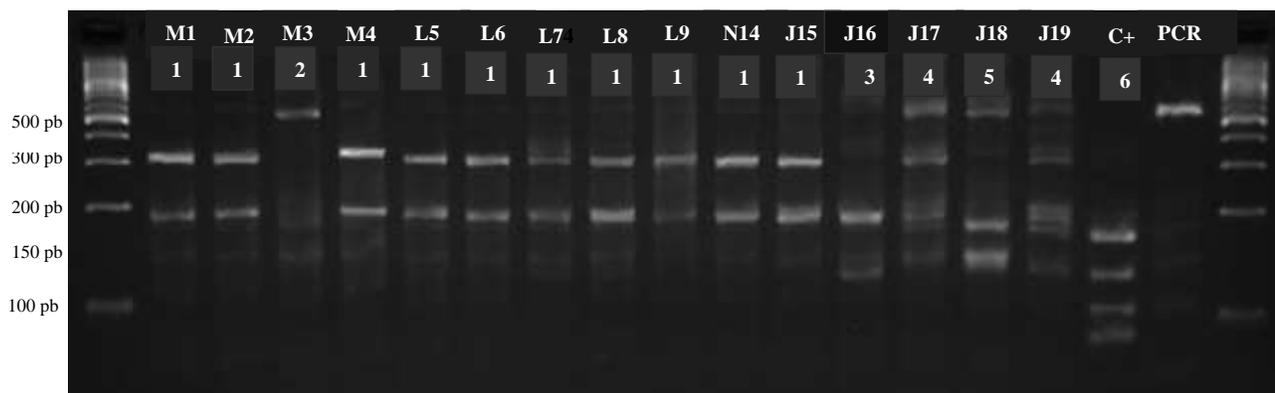


Figura 7. Electroforesis de digestión con la enzima *RsaI* en aislados de Masaya

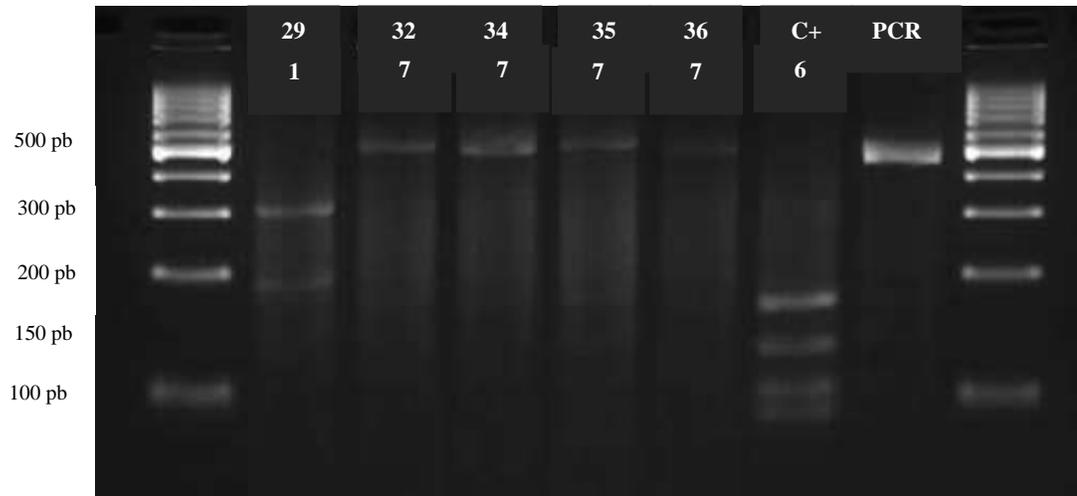


Figura 8. Electroforesis de digestión con la enzima *RsaI* en aislados de San Carlos-RSJ

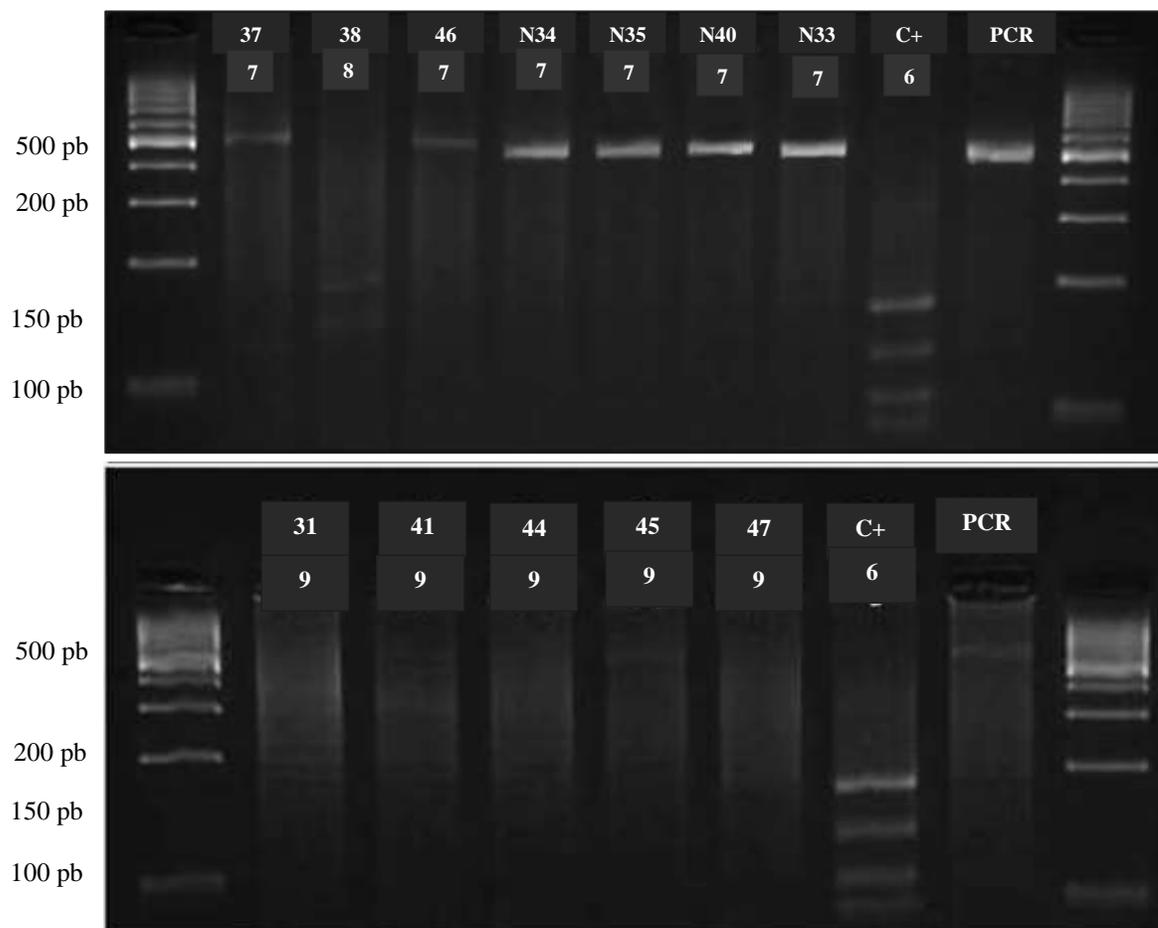


Figura 9. Electroforesis de digestión con la enzima *RsaI* en aislados de Nueva Guinea

*P. myriotylum* ha sido reportado afectando cultivos como jengibre, maní, tomate, quequisque entre otros. Perneel *et al.*, (2006), evaluó 51 cepas de *P. myriotylum* donde 40 fueron aisladas del cultivo de quequisque de plantaciones de Costa Rica y Camerún, 11 fueron aisladas de otros cultivos. En el estudio del análisis de secuenciación de la región ITS y análisis de esterasa se encontró que los aislados de quequisque de *P. myriotylum* poseen diferencia genética de los aislados de otros cultivos. Estudio realizado por Gómez-Alpizar *et al.*, (2011), en el cual compararon aislados de *P. myriotylum* de plantaciones de quequisque y otros cultivos, provenientes de Costa Rica y Camerún y otras especies de *Pythium*, encontraron que los aislados de *P. myriotylum* del cultivo de quequisque poseían diferencias en la región ITS1 e ITS 2 del ADN ribosómico nuclear (ADNr). Los mismos autores señalan que realizaron una PCR-FRLPs con la enzima de digestión *AarI*, obteniendo dos diferentes amplificaciones de bandas. Los aislados del cultivo de quequisque de *P. myriotylum* amplificaron a 400/600 pb y los aislados de otros huéspedes cortaron a 1000 pb. De esta manera llegaron a la conclusión que los aislados de *P. myriotylum* patógeno de quequisque posee especificidad con este cultivo. En la investigación de Alfaro-Araya, (2012), usando la técnica de PCR-RLFP en las muestras de ADN de aislados de *Pythium* sp con los cebadores mitocondriales Fm58 y Fm66 y la enzima de restricción *RsaI*, se determinó la presencia de *P. myriotylum* var *aracearum* y *Pythium* sp, en plantaciones de quequisque y otros cultivos. En la electroforesis de la PCR los cortes de bandas fueron de 600 pb, independiente si era *P. myriotylum* var *aracearum* o *Pythium* sp. Este mismo autor indica que al someter los productos PCR a la digestión de la enzima hubo diferenciación en los cortes de fragmentos en los aislados. Los aislados patógenos específicos de *P. myriotylum* en quequisque presentaron 4 cortes de bandas. En un estudio de Kageyama *et al.*, (1998), se utilizaron 12 enzimas de restricción incluyendo la enzima *RsaI*, dentro de la región ITS para caracterizar y diferenciar a *Pythium ultimum* con especies de *Pythium* que tuvieran como características morfológicas hifas hinchadas.

#### **5.4 Análisis de secuenciación**

La PCR-RFLPs demostró en la electroforesis que ninguno de los aislados obtenidos de las muestras de las tres zonas estudiadas fueron similares al control positivo, mostrando hasta siete diferentes cortes de bandas. Para el análisis de secuenciación se eligieron aislados que presentaron cortes de bandas similares por zona, para la identificación de las especies de

oomicetes. La secuenciación demostró que nueve aislados de Masaya pertenecen a *Pythium* sp. En las muestras de Nueva Guinea, se identificaron cinco aislados como *Phytopythium chamaehyphon*, cinco aislados como *Pythium deliense* y seis aislados como *Phytopythium vexans* (anteriormente conocido *Pythium cucurbitacerum*). De los aislados de San Carlos-RSJ, cinco se identificaron como *Phytopythium chamaehyphon* y un aislado como *Phytopythium helicoides*. En general, la especie predominante en las muestras fue *Phytopythium chamaehyphon* con diez aislados, seguido de *Pythium* sp., con nueve aislados (todos de Masaya), en tercer lugar, se ubicó *Phytopythium vexans* con seis aislados, seguido de *Pythium deliense* con cinco aislados, y, por último, de *Phytopythium helicoides* solamente se obtuvo un aislado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de *Pythium* y *Phytopythium* identificadas a través de secuenciación de las tres zonas de muestreo

| Género/especie                   | Número de aislados por zona |              |            |
|----------------------------------|-----------------------------|--------------|------------|
|                                  | Masaya                      | Nueva Guinea | San Carlos |
| <i>Pythium</i> sp                | 9                           | -            | -          |
| <i>Phytopythium chamaehyphon</i> | -                           | 5            | 5          |
| <i>Pythium deliense</i>          | -                           | 5            | -          |
| <i>Phytopythium vexans</i>       | -                           | 6            | -          |
| <i>Phytopythium helicoides</i>   | -                           | -            | 1          |
| <b>Total</b>                     | <b>9</b>                    | <b>16</b>    | <b>6</b>   |

Para la construcción del árbol filogenético se tomaron solamente ocho aislados que fueron secuenciados y eran provenientes de las tres zonas en estudio. Se utilizó como aislado de referencia *Pythium myriotylum* de Costa Rica. En este análisis filogenético, *Pythium cucurbitacearum* se agrupó con *Phytopythium vexans* con fuerte similitud (100%). Se ha reportado que *Pythium cucurbitacearum* tiene características morfológicas similares a las de *Phytopythium vexans* (Lévesque y de Cock, 2004; McLeod *et al.*, 2009). En una investigación llevada a cabo por Baten *et al.*, (2014), han encontrado hallazgos similares por lo que, en el futuro cercano, debido al alto grado de similitud genética, estas dos especies podrían fusionarse en una sola especie, la cual sería *Phytopythium vexans*. Otro aspecto importante que se debe señalar es que el aislado de referencia de Costa Rica, *Pythium myriotylum* se agrupó con un 100% de similitud con uno de los aislados provenientes de la zona de Nueva Guinea y que según la secuenciación resultó ser *Pythium deliense*. Este hallazgo podría indicar que se trata de la

misma especie o que tengan un ancestro común del cual se derivaron hace no mucho tiempo en el período evolutivo (Figura 10).

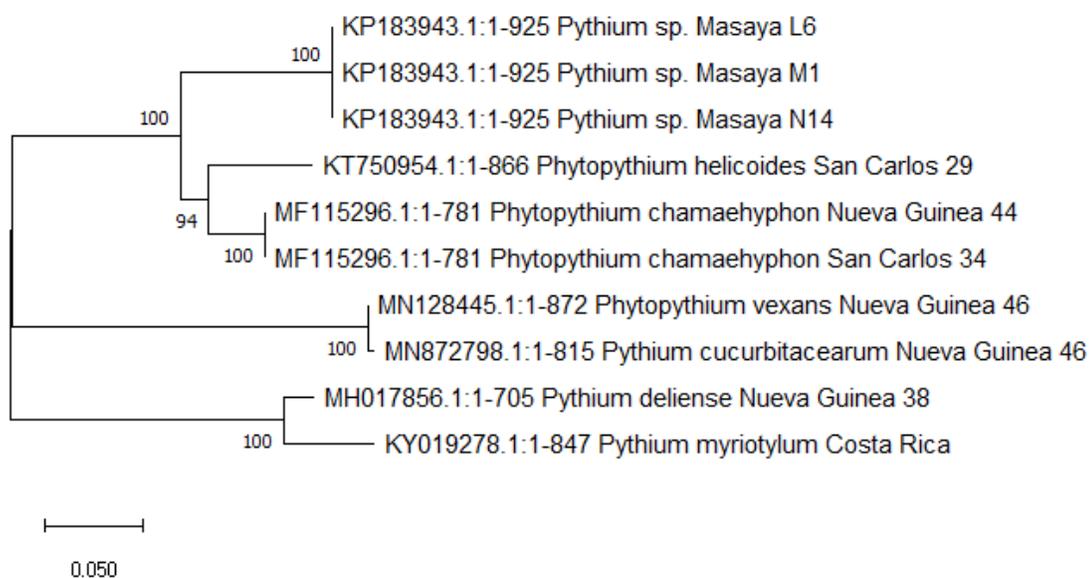


Figura 10. Filogenia de especies de *Pythium* y *Phytophthium* basada en la región del gen Cox II del ADN mitocondrial.

En la presente investigación originalmente se pensó que en el muestreo de suelo de la rizosfera y de raíces de plantas de quequisque que presentaban síntomas de mal seco se revelaría la presencia de *Pythium myriotylum* var. *aracearum* y por esta razón en el análisis PCR-RFLP se incluyó el aislado de referencia *P. myriotylum* var. *aracearum* de Costa Rica y la enzima de restricción *RsaI*. No obstante, el análisis de secuenciación evidenció hallazgos completamente diferentes a lo que se pensó inicialmente. Aunque en el presente estudio no se encontró al patógeno *P. myriotylum* var. *aracearum* en muestras de suelo y de raíces de plantas de quequisque que mostraban síntomas de mal seco, se aislaron las especies de *Pythium* sp y *Phytophthium* sp, para descartar la posibilidad que están relacionadas con la enfermedad antes mencionada es necesario realizar pruebas de patogenicidad. Se plantea esta hipótesis ya que el análisis de secuenciación reveló la presencia de estos dos oomicetes en las muestras que se procesaron de las tres zonas que se incluyeron en el presente estudio.

En estudios llevados a cabo en Brazil con el objetivo de identificar al agente causal de la pudrición radicular de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), encontraron a *Phytophthium* sp.,

como el agente primario de la enfermedad (Boari *et al.*, 2018; de Sousa Silva *et al.*, 2020). En Estados Unidos, Radmer *et al.*, (2017) realizaron una investigación sobre la causa de la muerte de la soya. El estudio mostró la presencia de varias especies de los géneros *Phytophthora*, *Pythium* y *Phytopythium*. Para cada uno de los grupos también se realizaron pruebas de patogenicidad en semillas de soya. *Phytopythium litorale* resultó ser una especie patógena en relación con la soya.

También en China se han llevado a cabo investigaciones relacionadas con la actividad patogénica del género *Phytopythium*. En el período 2010-2012, se observó la muerte regresiva de la planta de kiwi (*Actinidia chinensis*) que incluía síntomas tales como necrosis en los bordes de las hojas, rizado de las hojas, manchas necróticas oscuras en las raíces y el collar de la raíz. De las manchas necróticas se aisló a *Phytopythium helicoides* (Wang *et al.*, 2015). Síntomas similares (pudrición de la raíz, cuello de la raíz y decoloración oscura), así como pudrición de la fruta, se han observado en kiwi en Turquía y la patología se le ha atribuido a *Phytopythium vexans* (Polat *et al.*, 2017).

En Nicaragua, este es el primer reporte de la ocurrencia de *Phytopythium* en suelo rizosférico y raíces de plantas de quequisque con síntomas de pudrición radicular. Se requiere de estudios posteriores que tomen en consideración más lugares o sitios donde se siembre quequisque para realizar un análisis más exhaustivo que involucre la caracterización morfológica y molecular que incluya la secuenciación de los aislados que se obtengan de esos lugares.

## VI. CONCLUSIONES

- De los métodos usados para el aislamiento del género *Pythium* y otros oomicetes se determinó que el método por cebos de discos de hojas de quequisque en suelo y sembradas en el medio de cultivo V8 PARB se tuvo mayor éxito de aislamiento.
- Con la técnica PCR se identificó al género *Pythium* sp aislados de tres zonas de Nicaragua y con la técnica PCR-RFLP, se concluyó que ninguno de los aislados pertenece al patógeno *P. myriotylum* var *aracearum*.
- Se identificó mediante secuenciación diferentes especies de oomicetes de la rizosfera de quequisque encontrando *Pythium* sp, *Phytopythium helicoides*, *Phytopythium chamaehyphon*, *Pythium deliense*, *Phytopythium vexans*.

## VII. RECOMENDACIONES

- Realizar muestreos más amplios en zonas cultivadas con quequisque y con síntomas visibles de mal seco o pudrición radicular.
- Realizar pruebas de patogenicidad *in vitro* con especies de oomicetes identificados en este estudio.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Acevedo-Rodríguez P; and Strong, M.T. 2005. Monocotyledons and Gymnosperms of Puerto Rico and the Virgin Islands. Contributions from the United States National Herbarium 52:1-415.
- Afandi, A.; Murayama, E.; Hieno, A.; Suga, H.; and Kageyama, K. 2018. Population structures of the waterborne plant pathogen *Phytophthora helicoides* reveal its possible origins and transmission modes in Japan. PLoS One 13:1-15.
- Ahonsi, M.O.; Ling, Y.; and Kageyama, K. 2010. Development of SCAR markers and PCR assays for single or simultaneous species-specific detection of *Phytophthora nicotianae* and *Pythium helicoides* in ebb-and-flow irrigated kalanchoe. Journal of Microbiological Methods 83:260-265.
- Alfaro-Araya, B. 2012. Detección de *Pythium myriotylum* var. *aracearum* (Drechsler), causante del Mal Seco del tiquizque, en suelos de la Zona Norte de Costa Rica. Tesis. Universidad de Costa Rica.
- Almaraz-Sánchez, A.; Alvarado-Rosales, D.; and Saavedra-Romero, L.D.L. 2013. Trapping of *Phytophthora cinnamomi* in oak forests with two ornamental species and induction of sporulation. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 19, 5-12.
- Babu, B.; Hegde, V.; Makesh Kumar, T.; and Jeeva, M.L. 2011. Detection and Identification of Dasheen mosaic virus Infecting Colocasia esculenta in India. Indian Journal of Virology 22:59-62.
- Bala, K.; Robideau, G.P.; Lévesque CA, de Cock, A.W.A.M.; Abad, Z.G.; Lodhi, A.M.; Shahzad, S.; Ghaffar, A.; and Coffey, M.D. 2010. *Phytophthora* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi and Lévesque, gen. nov. and *Phytophthora sindhum* Lodhi, Shahzad and Lévesque, sp. nov. Persoonia 24:136-137.
- Baten, M.A.; Asano, T.; Motohashi, K.; Ishiguro, Y.; Rahman, M.Z.; Inaba, S.; Suga, H.; and Kageyama, K. 2014. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species, and re-evaluation of *Phytophthora fagopyri* comb. nov., recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. Mycological Progress 13:1145-1156.
- Binagwa, P. H.; Bonsi, C. K.; Msolla, S. N.; and Ritte, I. I. 2016. Morphological and molecular identification of *Pythium* spp. isolated from common beans (*Phaseolus vulgaris*) infected with root rot disease. African Journal of Plant Science, 10, 1-9.
- Boakye, A.A.; Wireko-Manu, F.D.; Oduro, I.; Ellis, W.O.; Gudjónsdóttir, M.; and Chronakis, I.S. 2017. Utilizing cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) for food and nutrition security: A review. Food Science & Nutrition 6:703-713.

- Boari, A.J.; Cunha, E.M.; Quadros, A.F.F.; Barreto, R.W.; and Fernandes, A.F. 2018. First report of *Phytophthium* sp. causing storage root rot and foliage blight of cassava in Brazil. *Plant Disease* 102:1042.
- Broders, K.D.; Wallhead, M.W.; Austin, G.D.; Lipps, P.E.; Paul, P.A.; Mullen, R.W.; and Dorrance, A.E. 2009. Association of soil chemical and physical properties with *Pythium* species diversity, community composition, and disease incidence. *Phytopathology* 99:957-967.
- Boakye, A.A.; Wireko-Manu, F.D.; Oduro, I.; Ellis, W.O.; Gudjónsdóttir, M.; Chronakis, I.S. 2017. Utilizing cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) for food and nutrition security: A review. *Food Science & Nutrition* 6:703-713.
- Centro de Trámites de las Exportaciones (CETREX). 2016. Exportaciones en el período 2006-2015. <https://www.cetrex.gob.ni/website/servicios/estadisticas.jsp>
- Coronell-Tovar, D.C.; Chávez-Jáuregui, R.N.; Bosques-Vega, A.; and López-Moreno, M.L. 2019. Characterization of cocoyam (*Xanthosoma* spp.) corm flour from the Nazareno cultivar. *Food Science and Technology Campinas* 39:349-357.
- De Cock, A.W.A.M.; Lodhi, A.M.; Rintoul, T.L.; Bala, K.; Robideau, G.P.; Abad, Z.G.; Coffey, M.D.; Shahzad, S.; and Lévesque, C.A. 2015. *Phytophthium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 34:25-39.
- De Oliveira, G.L.; Andrade, L.H.C.; and de Oliveira, A.F.M. 2012. “*Xanthosoma sagittifolium* and *Laportea aestuans*: species used to prevent osteoporosis in Brazilian traditional medicine”. *Pharmaceutical biology* 50:930-932.
- Degradandes-Rodríguez, N.A. 2018. Etiología de la vena amarilla en okra [*Abelmoschus esculentus* L. (Moench)] y manejo de su vector en la zona de Apacilagua, Choluteca, Honduras. Tesis. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Managua, NI. 59.
- de Sousa Silva, J.L.; Ishida, A.K.N.; Cunha, R.L.; Lima, A.M.; and Moura, E.F. 2020. Culture medium and inoculation methodology for the study of soft root rot caused by *Phytophthium* sp. *Ciência Rural, Santa Maria* 49:1-5.
- Díaz-Celaya, M.; Rodríguez-Alvarado, G.; Silva-Rojas, H. V.; Pedraza-Santos, M. E.; Salgado-Garciglia, R.; and Fernández-Pavía, S. P. 2011. Identification of *Pythium* species isolated from ornamental plants. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, (Especial 3)*, 431-443.
- El 19 Digital. 2020. Estos son los resultados de la producción de yuca, malanga y quequisque en Nicaragua (en línea). El 19 Digital, Managua, Nicaragua; 18 de febrero. Consultado 19 de febrero 2020. Disponible en [www.el19digital.com/articulos/ver/titulo:100218](http://www.el19digital.com/articulos/ver/titulo:100218).
- FAO. 2012. FAO statistical yearbook. World food and agriculture. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Fernández-Cruz, C. 2019. Evaluación de la patogenicidad de *Pythium myriotylum* var. *aracearum* sobre diferentes accesiones de tiquizque (*Xanthosoma* sp.). Tesis. Universidad de Costa Rica.
- Fukuta, S.; Takahashi, R.; Kuroyanagi, S.; Ishiguro, Y.; Miyake, N.; Nagai, H.; Suzuki, H.; Tsuji, T.; Hashizume, F.; Watanabe, H.; and Kageyama, K. 2014. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Pythium myriotylum*. Letters in Applied Microbiology 59:49-57.
- González-Moya, R.O. 2019. Métodos de aislamiento y patogenicidad de agentes asociados al mal seco en quequisque (*Xanthosoma violaceum* L. Schott), en Nicaragua. Tesis. Ing. Agr. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía. Managua, NI. 43.
- Gómez-Alpizar, L.; Saalau, E.; Picado, I.; Tambong, J.T.; and Saborío, F. 2011. A PCR-RFLP assay for identification and detection of *Pythium myriotylum*, causal agent of the cocoyam root rot disease. Letters of Applied Microbiology 52:185-192.
- Hernández Sampieri, R.; Fernández Collado, C.; y Baptista Lucio, M.P. 2010. Metodología de la Investigación. Quinta Edición. México, D.F. McGraw-Hill / Interamericana Editores, S.A. DE C.V. 656 p.
- Ho, H.H.; Chen, X.X.; Zeng, H.C.; and Zheng, F.C. 2012. The occurrence and distribution of *Pythium* species on Hainan Island of South China. Botanical Studies 53:525-534.
- Ho, H.H. 2018. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. Journal of Bacteriology & Mycology Open Access 6:40-45.
- Hüberli, D.; Tommerup, I.C.; and Hardy, G.E.St.J. 2000. False-negative isolations or absence of lesions may cause mis-diagnosis of diseased plants infected with *Phytophthora cinnamomi*. Australasian Plant Pathology 29:164-169.
- Jung, T.; Scanu, B.; Brasier, C.M.; Webber, J.; Milenković, I.; Corcobado, T.; Tomšovský, M.; Pánek, M.; Bakonyi, J.; Maia, C.; Bačová, A.; Raco, M.; Rees, H.; Pérez-Sierra, A.; and Jung, M.H. 2020. A survey in natural forest ecosystems of Vietnam reveals high diversity of both new and described *Phytophthora* taxa including *P. ramorum*. Forests 11:1-30.
- Kageyama, K.; Uchino, H.; and Hyakumachi, M. 1998. Characterization of the hyphal swelling group of *Pythium*: DNA polymorphisms and cultural and morphological characteristics. Plant disease, 82, 218-222.
- Kageyama, K.; Nakashima, A.; Kajihara, Y.; Suga, H.; and Nelson, E.B. 2005. Phylogenetic and morphological analyses of *Pythium graminicola* and related species. Journal of General Plant Pathology 71:174-182.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33:1870- 1874.

- Langworthy, C.F. and Duel, H.J. 1992. Digestibility of raw rice, arrow-root, canna, cassava, taro, tree-fern, and potato starches. *Journal of Biological Chemistry* 52:251-261.
- Lévesque, C.A.; and de Cock, A.W.A.M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108:1363-1383.
- Linde, C.; Kemp, G.H.J.; and Wingfield, M.J. 1994. *Pythium irregulare* associated with *Pinus* seedling death on previously cultivated lands. *Plant Disease* 78:1002-1005.
- Manner, H.I. 2011. Farm and forestry production and marketing profile for Tannia (*Xanthosoma* spp.). In: Elevitch, C.R. (ed.). *Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry*. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawaii. 16 p.
- Martin, F.N. 2000. Phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. *Mycologia*, 92, 711-727.
- Martin, F.N.; Tooley, P.W.; and Blomquist, C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94:621-631.
- Matthews, P.J. 1998. Taro in Hawaii: present status and current research. *Plant Genetic Resources Newsletter* 116:26-29.
- McLeod, A.; Botha, W.J.; Meitz, J.C.; Spies, C.F.J.; Tewoldemedhin, Y.T.; and Mostert, L. 2009. Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research* 113:933-951.
- Milián-Jiménez, M.D. 2018. Recursos genéticos de la malanga del género *Xanthosoma* Schott en Cuba. *Cultivos Tropicales* 39:112-126.
- Molina-Gayosso, E.; Andrade-Hoyos, P.; García-Espinosa, R.; y Sosa-Hernández, C. M. 2016. Capacidad de sobrevivencia de tres especies de *Phytophthora* y dos de *Pythium* preservados en dos sustratos a corto y largo plazo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7, 1759-1764.
- Nam, B.; and Choi, Y.J. 2019. *Phytophythium* and *Pythium* species (Oomycota) isolated from freshwater environments of Korea. *Mycobiology* 47:261-272.
- Nishanthini, A.; and Mohan, V.R. 2012 Antioxidant activities of *Xanthosoma sagittifolium* using various in vitro assay models. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3: S1701-S1706.
- Obidiegwu, J.E.; Kendabie, P.; Obidiegwu, O; and Amadi, C. 2016. Towards an enhanced breeding in cocoyam: A review of past and future research perspectives. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences* 5:22-33.

- Onyeka, J. 2014. Status of cocoyam (*Colocasia esculenta* and *Xanthosoma* spp) in West and Central Africa: Production, household, importance and the threat from leaf blight. Lima (Peru). CGIAR Research Program on Roots, Tubers and Bananas (RTB). 39 p.
- Osuji, J.; and Nwala, P. 2014. Epidermal and cytological studies on cultivars of *Xanthosoma* (L.) Schott. and *Colocasia* (L.) Schott. (Araceae). International Journal of Plant & Soil Science 4:149-155.
- Owusu-Darko, P.G.; Paterson, A.; and Omenyo, E.L. 2014. Cocoyam (corms and cormels) an underexploited food and feed resource. Journal of Agricultural Chemistry and Environment 3:22-29.
- Pacumbaba, R. P.; Wutoh, J. G.; Eyango, S. A.; Tambong, J. T.; and Nyochembeng, L. M. 1992. Isolation and pathogenicity of rhizosphere fungi of cocoyam in relation to cocoyam root rot disease. Journal of phytopathology, 135, 265-273.
- Paul, B. 2003. *Pythium carbonicum*, a new species isolated from a spoil heap in northern France, the ITS region, taxonomy and comparison with related species. FEMS Microbiology Letters 219:269-274.
- Paulitz, T.C., and Adams, K. 2003. Composition and distribution of *Pythium* communities in wheat fields in eastern Washington state. Phytopathology 93:867-873.
- Perneel, M.; Tambong, J.T.; Abiobo, A.; Floren, C.; Sabario, F.; Leveque, A.; and Hofte, M. 2006. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host plants. Mycological Research 110:583-593.
- Pettitt, T.R.; Wakeham, A.J.; Wainwright, M.F.; and White, J.G. 2002. Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. Plant Pathology 51:720-727.
- Pittis, J.E.; and Colhoun, J. 1984. Isolation and identification of pythiaceus fungi from irrigation water and their pathogenicity to *Antirrhinum*, tomato and *Chamaecyparis lawsoniana*. Journal of Phytopathology 110:301-318.
- Polat, Z.; Awan, Q.N.; Hussain, M.; and Akgül, D.S. 2017. First report of *Phytopythium vexans* causing root and collar rot of kiwifruit in Turkey. Plant Disease 101:1058.
- Prencipe, S.; Savian, F.; Nari, L.; Ermacora, P.; Spadaro, D.; and Martini, M. 2020. First report of *Phytopythium vexans* causing decline syndrome of *Actinidia deliciosa* 'Hayward' in Italy. Plant Disease 104:7.
- Radmer, L.; Anderson, G.; Malvick, D.M.; Kurle, J.E.; Rendahl, A.; and Mallik, A. 2017. *Pythium*, *Phytophthora*, and *Phytopythium* spp. associated with soybean in Minnesota, their relative aggressiveness on soybean and corn, and their sensitivity to seed treatment fungicides. Plant Disease 101:62-72.

- Rai, M.; Abd-Elsalam, K.A.; and Ingle, A.P. 2020. *Pythium*: diagnosis, diseases and management. CRC Press. 398 p.
- Redekar, N.R.; Eberhart, J.L.; and Parke, J.L. 2019. Diversity of *Phytophthora*, *Pythium*, and *Phytophthium* species in recycled irrigation water in a container nursery. *Phytobiomes Journal* 3:31-45.
- Ramanatha, R.V.; Matthews, P.J.; Eyzaguirre, P.B.; and Hunter, D. 2010. The global diversity of taro: Ethnobotany and conservation. Rome, Italy: Biodiversity International. 213 p.
- Ramírez-Reynosa, D.J.; y Rodríguez-Zamora, M.J. 2012. Diagnóstico de los agentes causantes del mal seco en el cultivo de quequisque (*Xanthosoma* spp) en el municipio de Nueva Guinea, Nicaragua. Tesis. Ing. Agr. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía. Managua, NI. 71 p.
- Riit, T.; Tedersoo, L.; Drenkhan, R.; Runno-Paurson, E.; Kokko, H.; and Anslan, S. 2016. Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding. *MycKeys*, 14, 17.
- Reyes, G.; Ramsell, J.N.E.; Nyman, M; and Kvarnheden, A. 2009. Sequence characterization of Dasheen mosaic virus isolates from cocoyam in Nicaragua. *Archives of Virology* 154:159-162.
- Schroeder, K.L.; Martin, F.N.; de Cock, A.W.A.M.; Lévesque, C.A.; Spies, C.F.J.; Okubara, P.A.; and Paulitz, T.C. 2013. Molecular detection and quantification of *Pythium* species: Evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease* 97:4-20.
- Sequeira-Orozco, M.I.; y Silva-Mendoza, Z.T. 2010. Manejo de mal seco (*Pythium myriotylum*) en quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) mediante la siembra tardía, control de arvenses, enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en Nueva Guinea, Nicaragua. Tesis. Ing. Agr. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía. Managua, NI. 46 p.
- Silva, J.L.D.S.; Ishida, A.K.N.; Cunha, R.L.; Lima, A.M.; and Moura, E.F. 2019. Culture medium and inoculation methodology for the study of soft root rot caused by *Phytophthium* sp. *Ciência Rural* 49:1-5
- Stevens, P. F. 2012. Angiosperm Phylogeny Website. version 13. St Louis, MO: Missouri Botanical Garden, University of Missouri.
- Tambong, J.T.; Poppe, J.; and Hofte, M. 1999. Pathogenicity and electrophoretic characterisation and detection of the root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. *European Journal of Plant Pathology* 105:597-607.
- Tambong, J.T.; de Cock, A.W.A.M.; Tinker, N.A.; Lévesque, C.A. 2006. Oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2691-2706.

- Themann, K.; Werres, S.; Diener, H.-A.; and Lüttmann, R. 2002. Comparison of different methods to detect *Phytophthora* spp. in recycling water from nurseries. *Journal of Plant Pathology* 84:41-50.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Tkaczyk, M. 2020. Phytophthium: origin, differences and meaning in modern plant pathology. *Folia Forestalia Polonica* 62:227-232.
- Ubalua, A.O. 2016. Cocoyam (taro and tannia): Staples with untapped enormous potentials – A Review. *Plant Knowledge Journal* 5:27-35.
- Uzuhashi, S.; Tojo, M.; and Kakishima, M. 2010. Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51:337-365.
- Van der Plaats-Niterink, A. J. 1981. Monograph of the genus *Pythium* (Vol. 21). Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Vaneker, K.; and Slaats, E. 2012. Mapping edible aroids. *Iridescent* 2:34-45.
- Villa, N.O.; Kageyama, K.; Asano, T.; and Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ -tubulin gene sequences. *Mycologia*, 98, 410-422.
- Watanabe, H.; Kageyama, K.; Taguchi, Y.; Horinouchi, H; and Hyakumachi, M. 2008. Bait method to detect *Pythium* species that grow at high temperatures in hydroponic solutions. *Journal of General Plant Pathology* 74:417-424.
- Wang, P.H.; Chung, C.Y.; Lin, Y.S.; and Yeh, Y. 2003. Use of polymerase chain reaction to detect the soft rot pathogen, *Pythium myriotylum*, in infected ginger rhizomes. *Letters of Applied Microbiology* 36:116-120.
- Wang, K.X.; Xie, Y.L.; Yuan, G.Q.; Li, Q.Q.; and Lin, W. 2015. First report of root and collar rot caused by *Phytophthium helicoides* on Kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Plant Disease* 99:725.
- Weightman, B.L.; and Moros, I.M. 1982. The cultivation of taro *Xanthosoma* sp. In: M. Lambert. *Taro Cultivation in the South Pacific*, pp. 74-83. SPC Handbook No. 22. South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia.
- Weiland, J.E. 2011. Influence of isolation method on recovery of *Pythium* species from forest nursery soils in Oregon and Washington. *Plant Disease* 95:547-553.
- Werres, S.; Ghimire, S.R.; and Pettitt, T.R. 2014. Baiting assays for detection of *Phytophthora* species in irrigation water. In *Biology, Detection and Management of Plant Pathogens in Irrigation Water*, pp. 125-138. Eds C.X. Hong, G.W. Moorman, W. Wohanka and C. Büttner. St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society.

Wokocha, R.C.; and Aduo, B.C. 2011. Pathogenicity of fungi associated with the cocoyam root rot blight complex in south-eastern Nigeria. *Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension* 10:49-54.

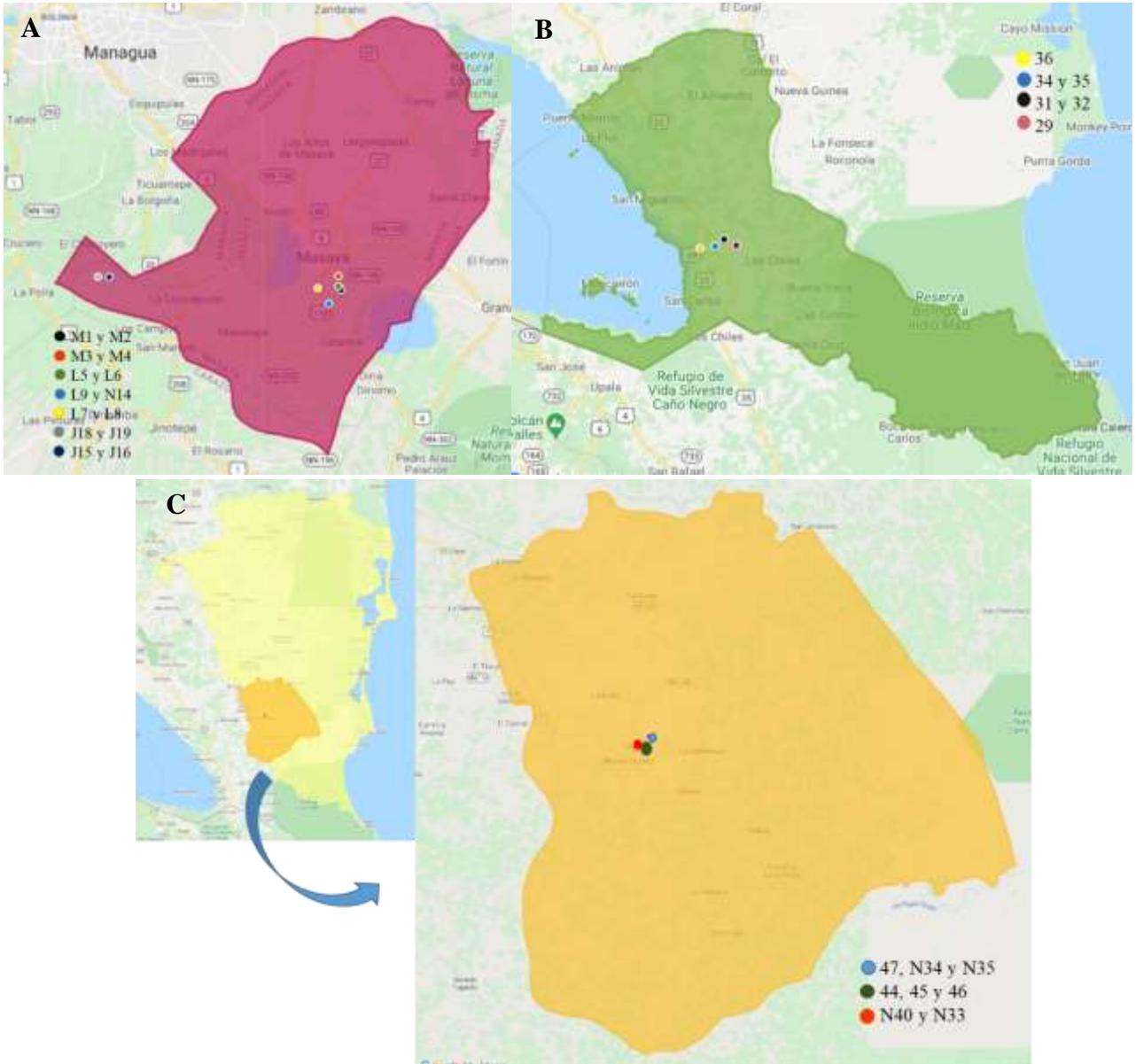
Zettler, F.W.; Foxe, M.J.; Hartman, R.D.; Edwardson, J.R.; and Christie, R.G. 1970. Filamentous viruses infecting dasheen and other araceous plants. *Phytopathology* 60:983-987.

## IX. ANEXOS

Anexo 1. Posición geográfica de los sitios de recolección de las muestras de suelo y raíces de quequisque en tres zonas de Nicaragua



Anexo 2. Posición geográfica de los sitios de recolección de muestras y códigos de aislados por departamento. **A** Departamento de Masaya. **B** Departamento de Río San Juan. **C** Departamento de Región Autónoma Costa Caribe Sur



Anexo 3. Código de muestra, localidad, municipio, departamento y coordenadas de los lugares de colecta de tejido y suelo de los aislados de la rizosfera de quequisque.

| Nº | Código de muestra | Localidad   | Municipio     | Departamento | Coordenadas    |                 |
|----|-------------------|-------------|---------------|--------------|----------------|-----------------|
|    |                   |             |               |              | Norte          | Oeste           |
| 1  | M1                | Pacayita 2  | Masaya        | Masaya       | 11° 56' 48.8"  | 086° 04' 34.7"  |
| 2  | M2                | Pacayita 2  | Masaya        | Masaya       | 11° 56' 48.8"  | 086° 04' 34.7"  |
| 3  | M3                | El túnel    | Masaya        | Masaya       | 11° 57' 23.53" | 086° 04' 95"    |
| 4  | M4                | El túnel    | Masaya        | Masaya       | 11° 57' 23.53" | 086° 04' 95"    |
| 5  | L5                | Pacayita 1  | Masaya        | Masaya       | 11° 56' 58.21" | 086° 04' 202"   |
| 6  | L6                | Pacayita 1  | Masaya        | Masaya       | 11° 56' 58.21" | 086° 04' 202"   |
| 7  | L7                | Pacayita 1  | Masaya        | Masaya       | 11° 56' 53"    | 086° 05' 03"    |
| 8  | L8                | Pacayita 1  | Masaya        | Masaya       | 11° 56' 53"    | 086° 05' 03"    |
| 9  | L9                | El túnel    | Masaya        | Masaya       | 11° 55' 740"   | 086° 05' 076"   |
| 10 | N14               | El túnel    | Masaya        | Masaya       | 11° 55' 740"   | 086° 05' 076"   |
| 11 | J15               | San Ignacio | La Concepción | Masaya       | 11° 57' 22.83" | 86° 14' 40.27"  |
| 12 | J16               | San Ignacio | La Concepción | Masaya       | 11° 57' 22.83" | 86° 14' 40.27"  |
| 13 | J18               | San Ignacio | La Concepción | Masaya       | 11° 57' 20.76" | 086° 15' 11.29" |
| 14 | J19               | San Ignacio | La Concepción | Masaya       | 11° 57' 20.76" | 086° 15' 11.29" |
| 15 | 37                | Río Plata   | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 42' 39.3"  | 084° 26' 46.2"  |
| 16 | 38                | Río Plata   | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 42' 39.3"  | 084° 26' 46.2"  |
| 17 | 41                | Río Plata   | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 42' 39.3"  | 084° 26' 46.2"  |
| 18 | 44                | Los Pintos  | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 42' 29.0"  | 084° 26' 39.4"  |
| 19 | 45                | Los Pintos  | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 42' 29.0"  | 084° 26' 39.4"  |
| 20 | 46                | Los Pintos  | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 42' 29.0"  | 084° 26' 39.4"  |
| 21 | 47                | Río Plata   | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 43' 10.11" | 084° 26' 01.58" |
| 22 | N34               | Río Plata   | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 43' 10.11" | 084° 26' 01.58" |
| 23 | N35               | Río Plata   | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 43' 10.11" | 084° 26' 01.58" |
| 24 | N40               | Río Plata   | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 42' 39.44" | 084° 26' 46.06" |
| 25 | N33               | Río Plata   | Nueva Guinea  | RACCS        | 11° 42' 39.44" | 084° 26' 46.06" |
| 26 | 29                | México      | San Carlos    | Río San Juan | 11° 16' 45.72" | 084° 39' 39.62" |
| 27 | 31                | Sto Domingo | San Carlos    | Río San Juan | 11° 16' 7.99"  | 084° 45' 29.43" |
| 28 | 32                | Sto Domingo | San Carlos    | Río San Juan | 11° 16' 7.99"  | 084° 45' 29.43" |
| 29 | 34                | Cruz Verde  | San Carlos    | Río San Juan | 11° 16' 28.83" | 084° 42' 04.14" |
| 30 | 35                | Cruz Verde  | San Carlos    | Río San Juan | 11° 16' 28.83" | 084° 42' 04.14" |
| 31 | 36                | Cruz Verde  | San Carlos    | Río San Juan | 11° 17' 34.93" | 084° 41' 40.02" |

Anexo 4. Colecta de muestras de tejido y suelo del cultivo de quequisque. **A** Parcela muestreada. **B** Planta muestreada con síntomas iniciales de mal seco. **C** y **D** Muestras de raíces colectadas. **E** Muestras de suelo trasladadas al laboratorio.

