

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

USO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE *Pythium myriotylum* CAUSANTE DEL MAL SECO EN TIQUIZQUE (*Xanthosoma sp.*).

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de Maestría
Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de
Cultivos

IVANNIA PICADO CARTÍN

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2012

DEDICATORIA

A mi esposo y a mis Padres por su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre presente en mi vida, porque ha guiado cada una de las decisiones que he tomado tanto en mi vida profesional como en mi vida personal.

A mi esposo, padres, hermanos y sobrinos, que han apoyado todas las decisiones que he tomado, y me han mostrado su amor y cariño.

Al Dr. Francisco Saborío, por apoyarme siempre y preocuparse porque yo saliera adelante y termina esta maestría. Gracias Paco por confiar en mí, porque aparte de ser mi tutor te sentía como un amigo.

Al Dr. Luis Gómez, por creer en mí, por estar siempre pendiente de mi trabajo y por todas las enseñanzas que me dio. Gracias don Luis por alentarme a ir a Canadá a realizar el trabajo.

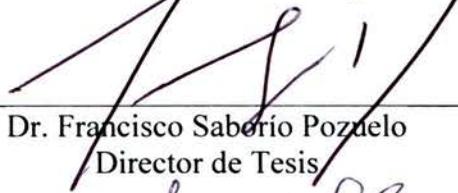
Al Dr. Tambong, por recibirme en su laboratorio (Canadá), por las todas las facilidades y el apoyo para la realización de la tesis.

A mis amigos (Caro, Danny, Bárbara, Pamela, Randall Vargas, Erika) por todo el apoyo, la motivación, ayuda y los buenos tiempos compartidos en el Laboratorio.

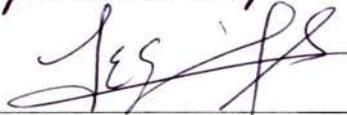
“Esta tesis fue aceptada por la comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de Cultivos”.



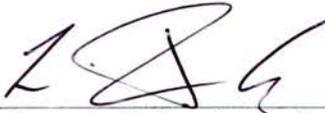
M.Sc. Mauricio Montero Astúa
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



Dr. Francisco Sabarrio Pozuelo
Director de Tesis



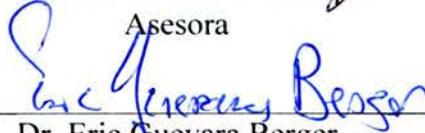
Dr. Luis Gómez Alpizar
Asesor



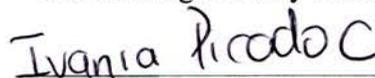
Dr. Luis Felipe Arauz Cavallini
Asesor



Dra. Julieta Carranza Velásquez
Asesora



Dr. Eric Guevara Berger
Director Programa de Posgrado en
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Ivannia Picado Cartín
Candidata

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
RESUMEN GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1. 1. El cultivo.....	4
1. 2. Requerimientos de cultivo.....	5
2. PRACTICAS DE CULTIVO.....	6
2.1. Siembra.....	6
2.2 Manejo de arvenses.....	7
2.3 Fertilización.....	7
2.4. Plagas y enfermedades.....	8
2.5. Cosecha.....	9

2.6. Manejo post-cosecha.....	10
3. SITUACIÓN DEL TIQUIZQUE EN COSTA RICA.....	10
4. EL MAL SECO, PRINCIPAL LIMITANTE DE LA PRODUCCIÓN DE TIQUIZQUE.....	11
4.1. El patógeno.....	13
4.2. Identificación de la enfermedad.....	17
4.3. Control.....	18
5. OBJETIVO GENERAL.....	20
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
7. LITERATURA CONSULTADA.....	21
<u>CAPITULO II</u>	30
Evidencia filogenética de especificidad por hospedero en <i>Pythium myriotylum</i>, agente causal del Mal Seco en tiquizque.....	30
1. RESUMEN.....	31
2. INTRODUCCIÓN.....	32
3. METODOLOGÍA.....	35
3.1. Aislamientos.....	35
3.2 Extracción de ADN.....	39
3.3Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético.....	41

4.RESULTADOS.....	42
5. DISCUSIÓN.....	51
6. LITERATURA CITADA.....	56
<u>CAPITULO III</u>	64
Identificación molecular de <i>Pythium myriotylum</i> agente causal del Mal Seco en Tiquizque (<i>Xanthosoma spp.</i>) en Costa Rica mediante la técnica PCR-RFLP.....	64
1. RESUMEN.....	65
2. INTRODUCCIÓN.....	66
3. MATERIALES Y METODOS.....	69
3.1. Extracción de ADN.....	71
3.2. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR).....	72
3.3. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	73
4. RESULTADOS.....	73
5. DISCUSIÓN.....	78
6. LITERATURA CONSULTADA.....	82
<u>CAPÍTULO IV</u>	88
1. DISCUSION GENERAL.....	89
2. LITERATURA CONSULTADA.....	92

RESUMEN GENERAL

El Mal Seco en tiquizque (*Xanthosoma sp.*), causado por *Pythium myriotylum*, es considerada una de las enfermedades más destructivas en este cultivo. En Costa Rica, Puerto Rico y Camerún se reportan pérdidas de hasta un 90% en el campo. En Costa Rica, el Mal Seco se ha observado tanto en tiquizque blanco como en tiquizque morado, en todas las regiones productoras, con una incidencia que varía desde un 5 % hasta un 100%. Los lotes afectados no pueden utilizarse de nuevo para la siembra de tiquizque, porque la enfermedad reaparece con una incidencia y severidad mayor.

Los estudios bioquímicos y moleculares han revelado evidencias de especiación en los aislamientos provenientes de tiquizque con respecto a los aislamientos de otros hospederos y se ha propuesto denominar a estos aislamientos *P. myriotylum* var. *Aracearum*.

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar molecularmente a *Pythium myriotylum* var. *Aracearum* por medio del análisis de una región nuclear del gen de la β -tubulina y de dos regiones mitocondriales correspondientes a los genes COX I y COX II con el fin de profundizar en el conocimiento filogenético de este microorganismo.

En una primera parte del trabajo se secuenciaron los genes mitocondriales COX I y COX II y el gen nuclear β -tubulina de treinta y dos aislamientos de *Pythium myriotylum*, veintinueve identificados como patogénicos y cuatro como no patogénicos a tiquizque. Una vez obtenidas las secuencias se generaron los árboles filogenéticos por medio del criterio de máxima parsimonia y máxima verisimilitud disponibles en el programa PAUP * 4.0b10.

Los alineamientos múltiples de secuencias obtenidas revelaron varias sustituciones transicionales entre los aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos a tiquizque y los no patogénicos. El análisis de los árboles generados mediante máxima parsimonia y máxima verisimilitud de los tres genes, agrupa a los aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos al tiquizque en un grupo único, diferente al de los aislamientos patogénicos a otras especies, lo cual constituye una evidencia más de la especialización por hospedero de los aislamientos patogénicos a tiquizque.

En la segunda parte del trabajo se amplificó, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una región del gen de la citocromo oxidasa subunidad II (COXII) de aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque y de otros hospederos, así como de otras especies de *Pythium*. El producto de PCR fue digerido, independientemente, con distintas enzimas de restricción. Con la enzima RSA I el patrón de restricción de los aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos a tiquizque difirió del patrón de los aislamientos no patogénicos y de las diferentes especies de *Pythium* evaluadas. Este resultado generó un método seguro, rápido y preciso para la identificación de los aislamientos patogénicos a tiquizque de otros aislamientos de *P. myriotylum*. Por otra parte es una evidencia más en apoyo a la hipótesis de especiación de *P. myriotylum* en tiquizque.

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO II

Cuadro 1. Lista de especies de *Pythium* y *Phytophthora* usadas en este estudio.....36

CAPITULO III

Cuadro1. Aislamientos de *Pythium* utilizados en este estudio.....70

Cuadro2. Comparación de las secuencias del COXII, entre los aislamientos de *P.myriotylum* patogénicos a Tiquizque, los aislamientos de *P.myriotylum* de otros hospederos y otras especies de *Pythium*. Alineamiento múltiple con Bioedit (Hall 1999).....75

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

Fig. 1. Síntomas típicos producidos por *Pythium myriotylum* en hojas y raíces.....12

Figura 2. Estructuras reproductivas tanto femeninas como masculinas de diferentes especies de *Pythium*. (a) varios tipos de esporangios; (b) tipos de órganos sexuales (oogonios y anteridios), dibujados por Poppe, 1995.....16

CAPITULO II

Figura 1. Uno de los 4 árboles más parsimoniosos determinados a partir de secuencias del gen β - tubulina de los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*.....45

Figura 2. Árbol consenso obtenido mediante el análisis de máxima verisimilitud a partir de las secuencias del gen β - tubulina de los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*.46

Figura 3. Uno de los 16 árboles más parsimoniosos determinados a partir de secuencias del gen citocromo oxidasa uno (COXI) de los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*.....47

Figura 4. Árbol consenso obtenido mediante el análisis de máxima verisimilitud a partir de las secuencias del gen COXI de los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*.....48

Figura 5. Uno de los 23 árboles más parsimoniosos determinados a partir de secuencias del gen citocromo oxidasa dos (COXII) de los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*.49

Figura 6. Árbol consenso obtenido mediante el análisis de máxima verisimilitud a partir de las secuencias del gen citocromo oxidasa dos (COXII) de los aislamientos de *P.myriotylum* de Tiquizque y otras especies de *Pythium*.....50

CAPITULO III

Figura 1. Gel de agarosa al 1.6% donde se observa el fragmento de ADN amplificado con los imprimadores FM66 y FM58 de la región mitocondrial COXII, carriles 1, 2, 3,4, 9, 10,11,12,y13: aislamientos de *P.myriotylum* de Tiquizque (CMR10,CMR10,CMR5,CMR5,CMR3,CR2,CR2,CR10,C11); carriles 5, 6, 7, 8: raíces infectadas con *P.myriotylum* de plantas provenientes de campo, carril 14 *P.myriotylum* (Tabaco); carril 15 *P.myriotylum* (Piña); carril 16 *P.myriotylum* (*Gypsophila*); carril 17 *P. inflatum* (Suelo), carril 18, control negativo.....76

Figura 2. Digestión enzimática del producto de amplificación de la región COXII con la enzima RsaI. Carriles 1, 2, 3,4, 9, 10, 11,12, y 13 (CMR10,CMR10,CMR5,CMR5,CMR3,CR2,CR2,CR10,C11) : aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque; carriles 5, 6, 7,8: raíces infectadas con *P.myriotylum* de plantas provenientes de campo, carril 14 *P.myriotylum* (Tabaco); carril 15 *P.myriotylum* (Piña); carril 16 *P.myriotylum* (*Gypsophila sp.*); carril 17 *P. inflatum* (Suelo), carril 18, producto de amplificación sin digerir (600 pb).....76

Figura 3. Gel de agarosa al 1.6% mostrando el fragmento de ADN amplificado con los imprimadores FM66 y FM58 de la región mitocondrial COXII, carriles 1, 2, 3, 4, 7 (CMR10, CMR5, CR2, CR10, C11): aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque; carriles 5 y 6: raíces infectadas con *P.myriotylum* de plantas provenientes de campo, carriles 8, 9 y 10 *P.myriotylum* (Tabaco); carril 11 *P.myriotylum* (*Gypsophila sp.*); y carril 13 control negativo.....77

Figura 4. Digestión enzimática del producto de amplificación de la región COXII con la enzima RsaI. Carriles 1, 2, 3, 4 y 7 (CMR10, CMR5, CR2, CR10, C11) aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque; carriles 5 y 6 raíces infectadas con *P.myriotylum* de plantas provenientes de campo, carriles 8 y 9 *P.myriotylum* (Tabaco); carriles 10 y 11 *P.myriotylum* (*Gypsophila sp.*); carril 12 producto de amplificación sin digerir (600 pb).....77

Figura 5. Gel de agarosa al 1.6% donde se observa el fragmento de ADN amplificado con los imprimadores FM66 y FM58 de la región mitocondrial COXII, Calles 1, 2, 3, 4 y 5(CMR10, CMR5, CR2, CR10, C11); aislamientos de *P.myriotylum* de Tiquizque; carril 6 *P.myriotylum* (Tabaco); carril 7 *P.myriotylum* (*Gypsophila sp.*); calle 8 y 9 *Fusarium sp.*; Carril 10 y 11 *Rhizoctonia sp.*, carril 12 control negativo.....78

LISTA DE ABREVIATURAS.

- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism.
- COX I: citocromo oxidasa I.
- COX II: citocromo oxidasa II.
- DsMV: Dasheen Mosaic Virus o virus del mosaico de la malanga.
- ITS: Internal Transcribed Spacer region.
- LBP: Laboratorio de Biotecnología de plantas.
- LSU: the 28S Large Subunit.
- NCBI: GenBank.
- PARC: Corn meal agar + Pimaricina + Rifampicina + Ampicilina
- PDB: Potato Dextrosa Broth.
- PCR: Polymerase Chain Reaction.
- rADN: ADN ribosomal.
- RFLP: Restriction fragment length polymorphism.
- Uv: luz ultravioleta.

INTRODUCCIÓN

El tiquizque (*Xanthosoma sagittifolium*), conocido en los países de habla inglesa como cocoyam es una planta herbácea de la familia Araceae. Posee un rizoma cormoso principal, subterráneo, a partir del cual se generan rizomas secundarios o cormelos. Estos cormelos son comestibles y son parte de la dieta básica de aproximadamente 200 millones de personas en países de toda la franja tropical en Asia, África y América (Tambong *et al.*, 1999). El cormo, bulbos secundarios, y hojas del tiquizque, son una fuente importante de carbohidratos para la nutrición humana y la alimentación animal (Ndoumou *et al.*, 1995; Nyochembeng y Garton, 1998).

En Costa Rica, las políticas de diversificación y el estímulo a la exportación de cultivos no tradicionales durante la década de los 80 propiciaron un incremento en el área sembrada de tiquizque, la cual aumentó de 359 a 3678 ha en un lapso de 16 años: sin embargo, en los últimos años el área se ha reducido debido a la presencia de enfermedades (Procomer, 2007).

El cultivo del tiquizque se ve afectado principalmente por dos enfermedades, el Virus del Mosaico de la Malanga (*Dasheen mosaic virus*(DsMV)) y el Mal Seco. La primera causa una reducción en la producción de hasta 24 % en tiquizque blanco y un 51% en tiquizque lila (Valverde *et al.*, 1997; Morales, 2007). Por su parte, el Mal Seco conocido también como: cocoyan root rot blight, dry root rot, o Apollo disease (Saborío, 2004), puede causar hasta 100% de pérdidas en producción, según el momento de

aparición en el ciclo del cultivo (Laguna *et al.*, 1983; Morales, 2007). Existen divergencias en cuanto al agente causal del Mal Seco debido a que se han aislado diversos patógenos de las plantas enfermas. No obstante, varios autores atribuyen esta enfermedad a *Pythium myriotylum* Drechs. (Pacumbaba *et al.*, 1992; Tambong *et al.*, 1999).

En estudios realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (LBP), para comparar la patogenicidad de diferentes hongos (*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum*) aislados a partir de las raíces de plantas enfermas de tiquizque, se ha encontrado que solo *Pythium myriotylum* es capaz de cumplir con los postulados de Koch (Ureña *et al.*, en preparación), razón por la cual los estudios de esta enfermedad se han centrado en este microorganismo.

Estudios realizados en Bélgica por Tambong *et al.* (1999), y más recientemente por Perneel *et al.* (2006), han mostrado que los aislamientos de *Pythium myriotylum* de tiquizque, muestran diferencias fisiológicas, bioquímicas y moleculares con respecto a los aislamientos de *Pythium myriotylum* aislados de otras plantas (sorgo, piña, tabaco, *Gypsophila sp.*, frijol). Asimismo, en Costa Rica, se ha observado que el *P. myriotylum* aislado de tiquizque posee un ámbito de hospederos muy reducido (Muñoz *et al.*, 2011).

El presente estudio pretende profundizar en la caracterización molecular de la especie de *Pythium myriotylum* asociada al tiquizque en Costa Rica y Camerún, mediante la amplificación y secuenciación de genes nucleares y mitocondriales, y su comparación con secuencias de *P. myriotylum* de otros hospederos y de otras especies de *Pythium*, con el fin de tener un mayor conocimiento de este microorganismo, que permita a futuro desarrollar estrategias para su control.

CAPITULO I
REVISIÓN DE LITERATURA

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1. 1. EL CULTIVO

El tiquizque (*Xanthosoma sp.*), también conocido como macal, malanga, mangaras, okumo, quiscamote, tannia y taro entre otros (Giacometti *et al.*, 1994), es originario de la parte norte de América del Sur, pero su distribución en el continente americano abarca desde Perú hasta México (León, 1987). Es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia Araceae. Posee un tallo subterráneo o apenas expuesto, modificado, a partir del cual se producen brotes que generarán los cormelos comestibles; el color de la pulpa puede ser blanco, rosa, morado o amarillo según la variedad; sus hojas tienen el pecíolo largo, son grandes (1-2 metros de largo), de lámina sagitada y bilobulada que al unirse por su base forman un pseudotallo cilíndrico (León, 1987). La floración es poco frecuente pero, cuando se produce, la inflorescencia consiste en una espádice cilíndrica, las flores son unisexuales, con flores femeninas situadas en la base de la espádice y flores masculinas en la parte superior, la floración es más propensa a ocurrir en regiones húmedas (Purseglove, 1972).

El género *Xanthosoma* incluye más de 45 especies, de las cuales pocas son comestibles. *X. sagittifolium* (tiquizque blanco) y *X. violaceum* (tiquizque morado), son las dos únicas especies que se utilizan con este fin en Costa Rica (Torres *et al.*, 2000). Estas especies presentan diferencias en el color de los cormelos, en la productividad y resistencia

a enfermedades (Pacumbaba *et al.*, 1992; Wutoh *et al.*, 1994; Tambong *et al.*, 1999; Onokpise *et al.*, 1999; Tambong y Höfte, 2001; Temgo *et al.*, 2002; Boudjeko *et al.*, 2005).

El crecimiento y ciclo de desarrollo de estas dos especies se puede dividir en tres periodos: un primer periodo de dos meses en el cual el crecimiento es lento. Este periodo se inicia con el surgimiento del brote apical y termina con el surgimiento de los cormos secundarios o cormelos; el segundo periodo inicia a los 6 o 7 meses después de la siembra, se caracteriza por un incremento en el área foliar de la planta; finalmente, durante el tercer periodo las hojas comienzan a marchitarse y se da el llenado de los cormelos (Wilson, 1984; López *et al.*, 1995).

1. 2. REQUERIMIENTOS DE CULTIVO

El tiquizque es un cultivo de clima estrictamente cálido (Onwueme & Charles, 1994) que se ha convertido en un cultivo de clima tropical (Wilson, 1984). Se cultiva en zonas tropicales y subtropicales, entre las latitudes 30 grados norte y 15 grados sur del ecuador (López *et al.*, 1995), no se adapta a condiciones de inundación, pero a pesar de que es un cultivo de tierras bajas (Onwueme, 1978), crece bien en zonas altas, con suelos bien drenados y un clima en el que las precipitaciones (1200 -2000mm) estén bien distribuidas durante la mayor parte del año. La temperatura media anual de 30°C se considera buena para su producción comercial, temperaturas inferiores a 18 °C desaceleran el crecimiento de las hojas, y temperaturas por encima de 35 °C limitan la formación de los cormelos. Se requieren suelos profundos, bien drenados y de textura media, con un pH promedio de 5.5 a 6.4. Los suelos que sufren anegamiento no son convenientes para la siembra de este

cultivo ya que facilitan la pudrición de las raíces y los cormelos. Puede tolerar cierta cantidad de sombra (López *et al.*, 1995).

2. PRÁCTICAS DE CULTIVO

2.1. SIEMBRA

La siembra debe realizarse en lomillos bien conformados que permitan un buen drenaje superficial de las aguas. La altura del lomillo debe ser de 40-50 cm de alto con una separación entre ellos de 1.20-1.50 m. La distancia entre plantas en una siembra lineal varía entre 40-50 cm entre plantas, para una densidad de siembra de 13.000 a 18.000 plantas/ha (Wilson, 1984)

Para la siembra comercial de tiquizque se recomienda el uso de trozos de corno provenientes de la cabeza o corno central con un peso entre 120-150 gramos o bien cormelos que no clasificaron para la exportación. Previo a la siembra la semilla se debe desinfectar, lo cual se puede hacer de dos maneras:

- Se sumerge la semilla por 10 minutos en productos como benomil, estreptomycin y TCMTB.
- Se pica la semilla, se extiende con los cortes hacia arriba y se asperja con productos como carboxin, tiram o TCMTB. El corno debe estar sin pudriciones, heridas o golpes y provenir de plantaciones que no hayan sufrido Mal Seco. Se recomienda además, que la semilla esté libre de Dasheen Mosaic Virus (Rodríguez, 2007). Para cumplir estas dos últimas recomendaciones es necesario visitar la plantación de la

cual se tomará la semilla y confirmar que no presente síntomas de Mal Seco ni de DsMV.

2.2 MANEJO DE ARVENSES

En las plantaciones de tiquizque el período crítico de competencia por malezas es durante los primeros 4 meses cuando los cormos secundarios comienzan a crecer (Purseglove, 1972). Para el control de arvenses durante este periodo se recomienda luego de la siembra aplicar un pre-emergente Gesaprim (Atrazina) + Prowl (Pendimetalina) a una dosis de 150 ml cada uno por bomba de 18 litros. Si existen arvenses pequeñas debe agregarse a la mezcla 100 ml de Paraquat. Cuando el efecto del pre-emergente haya desaparecido es necesario combatir las gramíneas con productos como Fusilade (Fluazifop-P-Butil) 60 ml/bomba, Galant (Haloxifop-Metil) 45 ml/bomba (Rodríguez, 2007).

2.3 FERTILIZACIÓN

El tiquizque responde bien a la fertilización orgánica y química, en suelos fértiles el cultivo desarrolla hojas exuberantes y produce rendimientos más altos. El crecimiento de las hojas y de los cormos secundarios se incrementa con la adición de fertilizantes (Chandler *et al.*, 1982; Wilson, 1984, Ramirez, 1992).

Se recomienda hacer una primera fertilización con 200 Kg/ha de 10-30-10 ó 12-24-12 al fondo del hoyo durante la siembra para un mejor aprovechamiento del fósforo. Una

segunda fertilización con 100 Kg/ha de Nutran, a los 22 días de brotado. A los 4 meses de brotado se recomienda fertilizar con 3 sacos/ha de 15-3-31, 20-3-20, 18-5-15-6-2 y a los 6 meses una última fertilización con 150 Kg de 15-3-31, 20-3-20, 18-5-15-6. Alrededor de los 2 meses del ciclo del cultivo el tiquizque presenta hijuelos los cuales se deben eliminar para evitar la competencia con aquellos de interés comercial (Rodríguez, 2007).

2.4. PLAGAS Y ENFERMEDADES.

En comparación con la malanga (*Colocasia*), el tiquizque se ve afectado por pocas enfermedades. Entre las principales están el Mal Seco y el virus de la malanga (DsMV), pero el tiquizque también puede verse afectado por otros patógenos como:

- *Sclerotium rolfsii*, este patógeno ataca la base del tallo, infecta las hojas y provoca la pudrición del cormo, lo que causa retrasos en el crecimiento.
- *Colletotrichum gloeosporioides*, que ataca principalmente las hojas.

La propagación vegetativa del tiquizque con sección de cormo y cormelos hace que este cultivo sea sensible a los virus y bacterias, que se transmiten con el material de propagación. El virus del mosaico de la malanga (DsMV), es el agente patógeno viral más importante de las aráceas en todo el mundo y se transmite a las plantas infectadas exclusivamente por áfidos. Los síntomas visibles son la distorsión de las hojas, clorosis de las venas, mosaico difuminado a lo largo de las venas, y en caso de un ataque severo, retraso en el crecimiento de plantas. Aunque DsMV no es letal, retarda el crecimiento de las plantas y reduce el rendimiento (Reyes *et al.*, 2006; Morales, 2007).

En América Latina y el Caribe, el tiquizque puede ser afectado por una enfermedad bacteriana llamada "mancha" o "tizón bacteriano". Los primeros síntomas son pequeñas manchas cloróticas sobre las hojas, que evolucionan en manchas más grandes necróticas rodeadas por un halo amarillo. Esta necrosis se extiende aún más hasta que finalmente las hojas afectadas se marchitan y mueren. Una infección severa puede matar a toda la planta. Los agentes causales son *Xanthomonas* spp. (*X. campestris* pv. *Aracearum* (Berniac) Dye, *X. campestris* (Pammel) Dowson y *X. axonopodis* pv. *Dieffenbachiae*) (Morales, 2007).

Las enfermedades poscosecha se producen a menudo y están relacionados con una ventilación y curación inadecuada de las heridas. Los agentes patógenos que se han encontrado en almacenamiento son: *Pythium splendens*, *Botryodiplodia theobromae*, *Sclerotium rolfsii*, *Erwinia chrysanthemi*, *Ceratocystis fimbriata* y *Fusarium oxysporum*.

En lo que respecta a plagas, *Fasciculatus araecus* es un escarabajo que puede dañar los tubérculos almacenados. La plaga más importante es el escarabajo Tannia (*Ligyris ebenus*), que daña los tubérculos en crecimiento. Se ha reportado en el Caribe, aunque no es un problema común. Una de las pocas plagas que atacan las hojas del tiquizque es el gusano del algodón (*Spodoptera littura*). Los áfidos y moscas blancas son plagas comunes, pero las pérdidas de rendimiento no están documentadas (Morales, 2007).

2.5. COSECHA

La cosecha se realiza a los 10 meses después de la siembra para el tiquizque blanco, y a los 12 meses para el tiquizque morado. El follaje empieza a secarse y el cormelo detiene su crecimiento. La cosecha se realiza manualmente, se jala la planta con fuerza,

también se puede realizar mecánicamente. Luego se procede a separar los cornelos y a clasificarlos según su tamaño.

2.6. MANEJO POST-COSECHA.

Luego de la cosecha en el campo los cornelos son llevados en sacos o cajas plásticas a la empacadora donde son lavados para eliminar suelo. La mayoría de los tratamientos de desinfección que se utilizan en tiquizque, no están aprobados para este cultivo, lo que ocasiona ciertos problemas. Los mejores tratamientos son con Benlate (Benomil), Kilol (extracto de semillas de cítricos) 750 y 1000 ppm y con cloro 150 ppm (Rodríguez, 2007)

3. SITUACIÓN DEL TIQUIZQUE EN COSTA RICA.

En la década de los 80, las políticas de diversificación incrementaron el área sembrada de tiquizque, la principal zona productora en un inicio fue la región Huetar Atlántica posteriormente el cultivo se extendió a la Región Huetar Norte (San Carlos, Sarapiquí), la Región Huetar Atlántica (Pococí, Guácimo, Siquirres), la Región Brunca (Buenos Aires, Pérez Zeledón, Osa, Corredores, Golfito y San Vito), la Región Central Sur y la Región Chorotega.

El área anual de siembra puede alcanzar hasta 3000 hectáreas, lo cual tiene un gran impacto social y económico, si se considera que el 80 % de esta producción se encuentra en

manos de pequeños y medianos productores que siembran en promedio de 1 a 2 ha al año (Torres *et al.*, 2000; Procomer, 2007).

En la Región Huetar Norte, el área sembrada para el 2007 fue de 526,9 hectáreas, donde el cantón con mayor área sembrada de tiquizque fue Upala, seguido con casi la mitad, el cantón de Los Chiles y San Carlos. Por otra parte en la Región Central Sur se sembraron 71.6 hectáreas, donde los cantones de Puriscal y Turrubares son los más importantes (Rodríguez, 2007).

Durante el 2009 el 61% de las siembras de raíces y tubérculos correspondió a siembras de yuca. Le siguen en importancia las siembras de tiquizque y luego de ñame, de malanga y de jengibre. De enero a julio de 2009 la oferta de tiquizque en el CENADA alcanzó las 316.86 toneladas, esta cifra fue levemente superior a la alcanzada en el 2008 (313,17 toneladas) (Procomer, 2007).

El principal destino de la producción de tiquizque es el mercado de los Estados Unidos, la población latina con influencia africana constituye el principal consumidor. De enero a mayo de 2009 el Departamento de Comercio de los Estados Unidos, informó que este país importó 18,983 toneladas de tiquizque, por un valor comercial de 20.22 millones de dólares, Costa Rica participó con un total de 3.508 toneladas, lo que representó para Costa Rica un total de 3,73 millones de dólares (Alvarado, 2009)

4. EL MAL SECO, PRINCIPAL LIMITANTE DE LA PRODUCCIÓN DE TIQUIZQUE.

El Mal Seco es considerado el factor más limitante en la producción de tiquizque, puede causar hasta un 100 % de pérdidas en la producción. En Costa Rica, el Mal Seco se ha observado tanto en tiquizque blanco como en tiquizque morado, en todas las zonas productoras, con una incidencia que varía desde un 5 % hasta un 100% en algunos lotes. Los lotes afectados no pueden utilizarse de nuevo para la siembra de tiquizque, porque la enfermedad reaparece con una incidencia y severidad mayor (Sergio Torres, comunicación personal).

Aunque la enfermedad es localizada en las raíces, los primeros síntomas son observados en las hojas. Comienza con una clorosis de las hojas que avanza a los pecíolos. Con el avance de la infección aparece clorótica toda la parte aérea de la planta y solo la hoja más joven mantiene el color verde (Fig.1). La planta detiene su crecimiento, los cormos que alcanzan a formarse son pequeños y escasos. Las raíces muestran una pudrición color café y al extraer la planta del suelo, solo se observa la médula de la raíz (Laguna *et al.*, 1983; Pacumbaba *et al.*, 1992; Tambong *et al.*, 1999; Saborío, 2004; Morales, 2007).



Fig. 1 Síntomas típicos producidos por *Pythium myriotylum* en hojas y raíces.

En años anteriores existió divergencia en cuanto al agente causal debido a que se aislaron diversos patógenos de las plantas enfermas, tales como: *Pythium splendens*, *P. myriotylum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Botryodiplodia theobromae*, *Sclerotium rolfsii* (*Corticium rolfsii*), así como bacterias del género *Erwinia* y *Pseudomonas* (Laguna *et al.*, 1983; Mora *et al.*, 1991; Bejarano *et al.*, 2001).

Varios autores han llegado a la conclusión que la enfermedad es causada únicamente por *P. myriotylum* (Pacumbaba *et al.*, 1992; Tambong *et al.*, 1999; Tambong y Höfte 2001; Perneel *et al.*, 2006)

4.1. EL PATÓGENO.

El género *Pythium* es complejo e incluye más de 100 especies de las cuales algunas son saprófitas facultativas y otras atacan a plantas, animales y humanos.

Pythium myriotylum es un patógeno de suelo con distribución mundial, aunque con predominio en los trópicos y subtropicos. Este patógeno causa daños en raíces y semillas en una gran variedad de cultivos que incluyen: jengibre, tiquizque, frijol, tomate, tabaco, sandía, caladium, papaya, coníferas, fresa, papa, pepino y maní. *Pythium myriotylum* puede ser patogénico en una gran variedad de plantas, especialmente a altas temperaturas (Van der Plaats-Niterink, 1981; Wang *et al.*, 2003; Perneel *et al.*, 2006).

P. myriotylum presenta un amplio ámbito de hospederos; sin embargo, algunos autores han encontrado evidencia de que los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de

plantas afectadas de tiquizque muestran cierto grado de especialización por este cultivo. Tambong *et al* (1999), compararon bioquímicamente los aislamientos de tiquizque con otros provenientes de diferentes cultivos como frijol, tabaco y tomate y encontraron diferencias isoenzimáticas, además de diferencias en la temperatura óptima de crecimiento. En otro estudio Perneel *et al.*, (2006) confirmaron los hallazgos de Tambong *et al.*, (1999) y además mencionan diferencias moleculares en la región del ITS (Internal Transcribed Spacer region) y otras regiones del genoma, con el uso de la técnica de AFLP. Por tales razones propusieron que los aislamientos patogénicos de tiquizque deben llamarse *Pythium myriotylum* var. *Aracearum*. Este nombre, que hace referencia a la familia y no solo al género, se escogió porque de acuerdo a los análisis moleculares existe otra áracea, *Amorphophallus konjac*, la cual es afectada por una cepa de *P. myriotylum* que muestra las mismas características moleculares que los aislamientos patogénicos a tiquizque; sin embargo, el aislamiento de *Amorphophallus konjac* no fue evaluado en plantas de tiquizque.

Este oomicete, relacionado más a las algas doradas que a los hongos verdaderos, posee un micelio filamentosos con hifas hialinas, con un diámetro de 5-7 μm . Dichas hifas, carecen de septos excepto cuando los cultivos son viejos o cuando ocurre la diferenciación hacia la producción de esporas (Van der Plaats-Niterink, 1981; Martín, 1992).

Pythium tiene un ciclo de vida con dos fases, una sexual y otra asexual. Cada fase se presenta según las condiciones ambientales. Cuando las temperaturas se encuentran entre los 10°C y los 18°C, ocurre el ciclo asexual que inicia con la liberación de las zoosporas que nadan hasta la superficie del hospedero, en donde se enquistan y germinan. El tubo germinativo penetra los tejidos del hospedante y dentro de él se forma un micelio

cenocítico, el cual eventualmente dará origen a una nueva generación de esporangios capaces de producir nuevas zoosporas sobre la superficie de la planta. Este ciclo asexual puede repetirse varias veces durante el desarrollo del hospedante. El ciclo sexual involucra la formación de estructuras sexuales. Las estructuras masculinas se denominan anteridios y la femenina oogonio. Los oogonios y los anteridios se desarrollan muy próximos, a menudo sobre la misma hifa (homotálico); el anteridio justamente por debajo del oogonio. Después de producirse el contacto gametángico se desarrolla un tubo de fecundación que penetra la pared oogonial y el periplasma. Entre tanto, en ambos gametangios ha tenido lugar la división nuclear, pero de todos los núcleos solo queda uno en cada gametangio. El único núcleo masculino pasa entonces a través del tubo a la oosfera y se acerca al núcleo femenino para unirse a él y formar el cigoto. El cigoto va a dar origen a una oospora lisa de pared gruesa que germina después de un periodo de inactividad. Este ciclo se presenta cuando la temperatura supera los 18 °C (Alexopoulos, 1964).

En lo que respecta a la caracterización morfológica, *Pythium myriotylum* pertenece al gran grupo de especies con oogonios de pared lisa, esporangios inflados y filamentosos. En este grupo se encuentran otras especies de importancia agronómica, entre las que se mencionan, *P. graminicola*, *P. arrhenomanes*, *P. aphanidermatum*, las cuales se diferencian de *P. myriotylum* porque esta especie presenta esporangios no diferenciados, inflados y filamentosos, terminales o intercalados algunas veces ramificados o digitados. El tubo germinativo alcanza 100 μm de largo y 2-4 μm de ancho. Los oogonios son globosos, terminales o intercalados con un diámetro de 26-32 μm , por lo general se encuentran de 3 a 6 anteridios por oogonio. La temperatura óptima de crecimiento es de 37° C, con un máximo de 40° C (Van der Plaats-Niterink, 1981) ver figura 2.

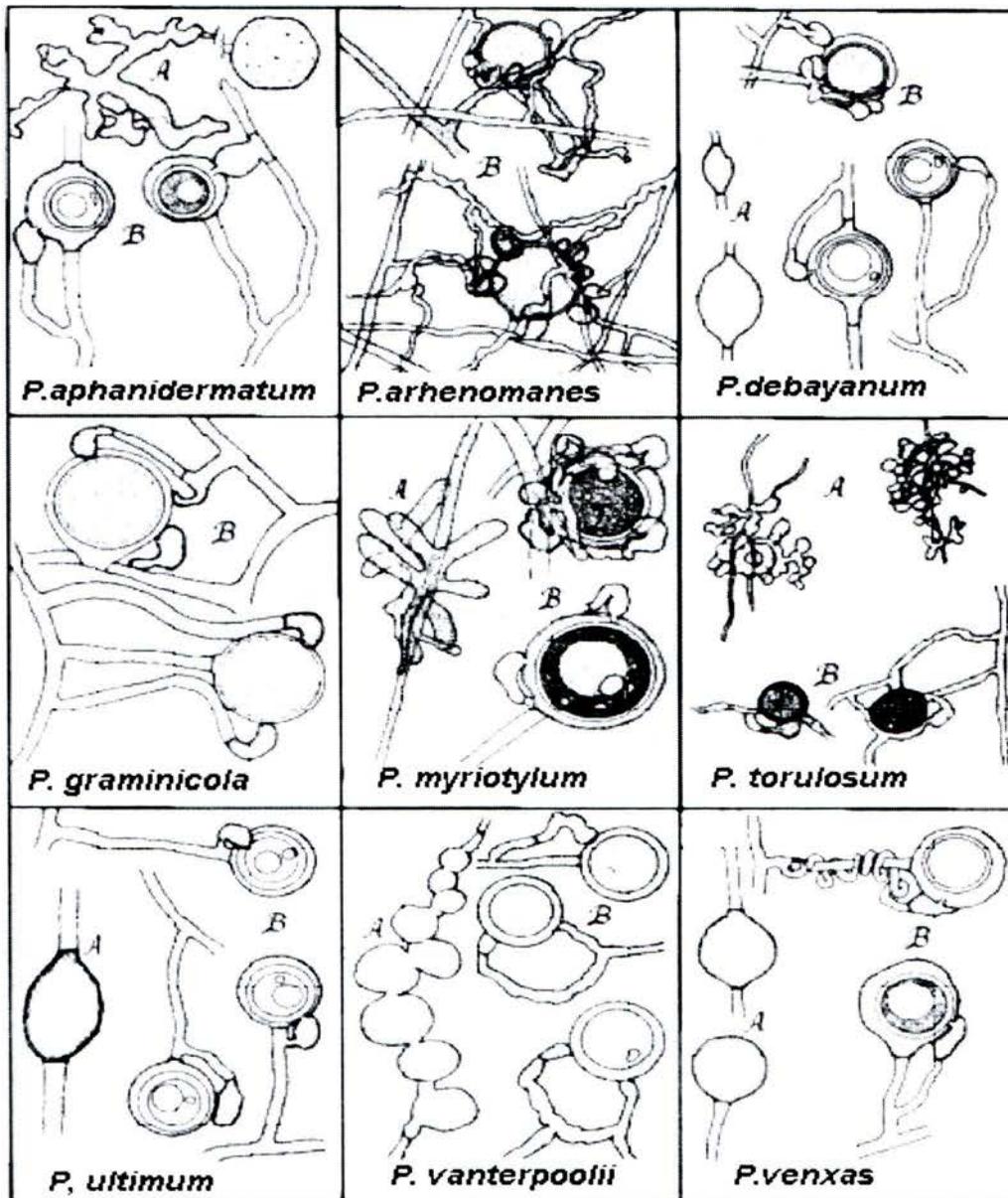


Figura 2. Estructuras reproductivas tanto femeninas como masculinas de diferentes especies de *Pythium*. (a) varios tipos de esporangios; (b) tipos de órganos sexuales (oogonios y anteridios), dibujados por Poppe, 1995.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD

La identificación tradicional de las especies de *Pythium* y de los hongos en general, se basa en características morfológicas; sin embargo, este método presenta la dificultad de que estas características pueden variar de acuerdo al medio de cultivo y a las condiciones en que se desarrolle. En algunos casos estas características pueden aparecer y desaparecer en el proceso evolutivo, lo que hace su identificación confusa y difícil, lo que a su vez dificulta los estudios patológicos de este organismo (Martin, 2000; Lévesque *et al.*, 2004; Kageyama *et al.*, 2005).

Alternativamente a la clasificación basada en caracteres morfológicos, es posible utilizar caracteres moleculares. Entre los más comunes se menciona el uso de secuencias del ADN ribosomal (rADN), el uso de secuencias de genes nucleares y de genes mitocondriales. Estas metodologías tienen la ventaja de que son reproducibles y permiten hacer una comparación rápida de una gran cantidad de aislamientos (Doss y Welty, 1995, Schilling *et al.*, 1996, Kageyama *et al.*, 2005).

En el presente estudio se pretende profundizar en la caracterización molecular de *P. myriotylum* asociado al tiquizque. Para ello se analizarán las secuencias de diferentes genes, específicamente la del gen mitocondrial COX II y la del gen nuclear β -tubulina: el gen mitocondrial citocromo oxidasa II codifica para la enzima que cataliza el último paso en la cadena de transporte electrónico en la respiración y el gen β -tubulina, codifica para una de las dos familias de tubulinas, que se encargan de la producción de microtúbulos que

intervienen en diferentes funciones como la formación del citoesqueleto (Villa *et al.*, 2006).

Las secuencias de estos genes se han utilizado en diversos estudios para establecer relaciones filogenéticas. En el género *Pythium* se han hecho estudios con estos genes, lo que permite establecer relaciones a nivel de subgéneros, niveles más bajos o establecer nuevas especies de *Pythium* (Martín, 2000; Kageyama *et al.*, 2004; Garzón, 2005; Villa *et al.*, 2006).

4.3. CONTROL

4.3.1 CONTROL CULTURAL

Se recomienda utilizar semilla limpia obtenida de lotes que no presentaron la enfermedad o plantas propagadas por cultivo de tejidos. No sembrar en áreas en las que se ha presentado la enfermedad. Realizar una adecuada preparación de terreno, sembrar en lomillos altos y eliminar cualquier exceso de humedad en el terreno. Es importante desinfectar la maquinaria con la que se prepara el terreno.

4.3.2 CONTROL QUIMICO

En suelos infestados, la severidad del ataque se puede reducir con la incorporación de Captan (Merpan) (112 K en el Kg/ha), antes de la siembra. La semilla también se puede sumergir en una solución de Captan (Merpan) (4g/l), o en una solución de Metalaxil (ridomil 1g/l) (Agrios, 1995)

4.3.3. CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico se puede realizar con *Pseudomonas aeruginosa* (Tambong and Achuo, 1997) o *Pseudomonas fluorescens* (Perneel *et al.*, 2003)

4.3.4. CONTROL POR MEJORAMIENTO CONVENCIONAL, RESISTENCIA, MUTACIONES Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.

La mayoría de los esfuerzos en el mejoramiento genético del tiquizque se han centrado en la introducción de resistencia al Mal Seco, aunque también se ha trabajado sobre el aumento de la producción, mejora de caracteres morfológicos, como peciolo más cortos, y mejora en la conservación postcosecha (Álvarez & Hahn 1983). Se han utilizado cuatro estrategias principales para el mejoramiento del tiquizque: mejoramiento convencional, inducción de mutaciones, inducción de poliploidía y transformación genética.

El mejoramiento genético convencional es difícil de implementar por varias razones: (i) poca frecuencia de floración en condiciones naturales, por lo general las plantas solamente florecen una vez al año; (ii) las flores femeninas están encerradas en la parte inferior de la espata durante el periodo receptivo, lo cual restringe la entrada de polinizadores; (iii) la estructura que rodea a las flores femeninas permite la acumulación de agua, que causa pudrición; (iv) falta de producción de semillas debido a la poca producción de polen. Todas estas razones hacen difícil la producción de plantas híbridas a pesar de que se reportan variedades que presentan cierto grado de resistencia al Mal Seco. Agueguia, 1998; Agueguia *et al.*, 1994; Wutoh *et al.* 1994.

Según la literatura (Esnard *et al.*, 1993), todas las variedades de *X. sagittifolium* son diploides y susceptibles al Mal Seco, algunas especies cultivadas poliploides (4X, 5X) han mostrado un grado de resistencia. En 1998 Tambong *et al.*, indujeron la producción de tetraploides mediante el uso de colchicina; sin embargo, no se tiene información sobre el comportamiento y características agronómicas de estas plantas.

Otras técnicas que han sido o son evaluadas para la generación de resistencia son la fusión de protoplastos y la inducción de mutaciones. En el 2004, Saborío *et al.*, obtuvieron 17 clones que presentaban una reducción en la susceptibilidad a *P. myriotylum*, estos mutantes se introdujeron *in vitro* para su multiplicación y posteriormente se evaluaron en invernadero pero no mostraron diferencias en el grado de susceptibilidad a la enfermedad. Actualmente el Laboratorio de Biotecnología de plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas trabaja en el aislamiento y fusión de protoplastos entre variedades silvestres y variedades comerciales y se ha trabajado en la inducción de mutaciones con el uso de rayos gamma.

5. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar molecularmente a *Pythium myriotylum* agente causal del Mal Seco del tiquizque.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Obtener las secuencias de los genes mitocondriales (COX I; COX II) y nuclear (β -tubulina) de *Pythium myriotylum* asociado a tiquizque y a otros hospederos (sorgo, piña, tabaco, *Gypsophila sp.*, frijol).
2. Comparar las secuencias de los genes mitocondriales (COX I; COX II) y nuclear (β -tubulina) de *Pythium myriotylum* asociado a tiquizque y del *P. myriotylum* asociado a otros hospederos (sorgo, piña, tabaco, *Gypsophila sp.*, frijol).
3. Analizar filogenéticamente la posición de *Pythium myriotylum* asociado a tiquizque con respecto al *P. myriotylum* asociado a otros hospederos (sorgo, piña, tabaco, *Gypsophila sp.*, frijol).

7. LITERATURA CONSULTADA.

AGRIOS G. N. 1995. Fitopatología. 2da ed. LIMUSA. México, Distrito Federal. 387 p.

AGUEGUIA A., FATOKUN C. A., HAHN S. K. 1994. The genetics of resistance to cocoyam root rot blight complex disease in (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schoott). Acta Horticulture 380: 438-442.

AGUEGUIA A. 1998. Progress in cocoyam breeding in Cameroun-1979 to 1987. In: Symposium of the International Society of Tropical Root Crops, pp.648-653.

ALEXOPOULOS C.J. 1964. Introducción a la micología. 2a. Ed. Universitaria de Buenos Aires. Capítulo 6:153p.

ALVARADO L.2009. Servicio de información e inteligencia de mercados. CNP. Boletín 3, agosto, 2009.

ÁLVAREZ N., HAHN S. 1983. Cocoyam breeding at the International Institute of Tropical Agriculture. In: Proc of the Caribbean Regional Workshop on Tropical Root Crops. David Dolby. (ed). ST. Augustine, Trinidad.

BEJARANO C., ZAPATA M., BÓSQUES A., RIVERA E. 2001. Diferentes niveles de ploidía como estrategia de control del Mal Seco en yautía (*Xanthosoma* spp). The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 1-2 (85): 69 – 82.

BOUDJEKO T., OMOKOLO N., DRIOUICH A., BALANGÉ A. 2005. Peroxidase and Pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. Journal of Phytopathology 153: 409 – 416.

CHANDLER J.V., IRIZARRY H., SILVA S. 1982. Nutrient uptake by taniens as related to stage of growth and effect of age on yields of the Morada variety. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico 66 (1): 1-10.

DOSS R., WELTY R. 1995. A polymerase chain reaction, based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopatology* 85: 913-917.

ESNARD J., FERWERDA E., RIVERA-AMADOR E., HEPPERLY P. 1993. Induction of tetraploidy in tanager cultivar var. "Inglesa" (*Xanthosoma sagittifolium*) 111:335-338.

GARZÓN C., GEISER D. , MOORMAN G. 2005. Amplified fragment length polymorphism analysis and internal transcribed spacer and CoxII sequences reveal a species boundary within *Pythium irregulare*. *Phytopathology* 95: 1489-1498.

GIACOMETTI D., LEÓN J. 1994. Tannia, yautia (*Xanthosoma sagittifolium*). *Neglected Crops: 1492 from a different perspective*. Plant Production and Protection Series No. 26. FAO, Rome, Italy. pp 253-258.

KAGEYAMA K., NAKASHIMA A., KAJIHARA Y. 2005. Phylogenetic and morphological analyses of *Pythium graminicola* and related species. *Journal of Genetic Plant Pathology*.71:174-182.

LEÓN J. 1987. *Botánica de los Cultivos Tropicales*, Lima, Perú. Segunda edición. IICA. San José, Costa Rica. 445 p.

LEVESQUE C. A., DE COCK A., 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research* 108: 1363-1383.

LÓPEZ M., VÁSQUEZ E., LÓPEZ F. 1995. *Raíces y tubérculos*. Pueblo y Educación, Universidad Central de Las Villas, Cuba. 312 pp.

MARTIN F. 1992. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. The American Phytopathological Society. 265 p.

MARTIN F. 2000. Phylogenetic relationships among *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrial encoded cytochrome oxidase II gene. *Mycological research* 92 (4): 711-727.

MORA J., GÓMEZ L., MORA, F. 1991. Pathogenicity of two bacteria associated with root rot of aroids. *CORBANA* 15: 16-19.

MORALES A. 2007. *Cultivo del tiquizque*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 26p

NDOUMOU D.O., TSALA G.N., KANMEGNE G., BALANGÉ A.P. 1995. In vitro induction of multiple shoots, plant generation and tuberization from shoot tips of cocoyam. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences* 318: 773-778

MUÑOZ, G. 2011. Evaluación de la patogenicidad de diversos aislamientos de *Pythium myriotylum*. Tesis presentada para optar por el grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 50p.

- NYOCHEMBENG L., GARTON S. 1998. Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53, 127-134
- ONOKPISE O.U., WUTHO J.G., NDZANA X., TAMBONG J.T., MEBOKA M.M., SAMA A.E., NYOCHEMBEN L., AGUEGIA A., NZIETCHUENG S., WILSON J.G., BURNS M. 1999. Evaluation of macabo cocoyam germplasm in Cameroon. Perspectives on new crops and new uses. J.Janick (Ed), ASHS Press, Alexandria. 394 – 396.
- ONWUEME I. C., CHARLES W.B. 1994. Cultivation of cocoyam. In: Tropical root and tuber crops. Production, perspectives and future prospects. FAO Plant Production and Protection Paper 126, Rome, pp. 139-161.
- ONWUEME I.C. 1978. Colocasia and Xanthosoma (Cocoyams). In: *The tropical tuber crops: yams, cassava, sweet potato, and cocoyam*. (Eds. J. Wiley & Sons Ltd). New York, pp. 589-606.
- PACUMBABA R.P., WUTOH J.G., EYANGO S.A., TAMBONG J.T., 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
- PERNEEL M., SAVAYEN A., LEMEIRE E., SABORÍO F., ADIOBO A., HÖFTE M. 2003. Root rot disease on cocoyam caused by *Pythium myriotylum* : pathogen

characterization and biological control. In: Abstracts 55 th International Symposium on crop Protection. Ghent, Belgium.

PERNEEL M., TAMBONG J.T., ADIOBO A., FLOREN C., SABORÍO F., LÉVESQUE A., HÖFTE M. 2006. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. *Mycological Research* 110 (5): 583-593.

PROCOMER (PROGRAMA DE COMERCIO EXTERIOR, CR). 2007. Estimaciones exportación de tiquizque. San José, Costa Rica. Consultado 22 Junio 2006. Disponible en <http://procomer.com/est/index.cfm>

POREBSKY S., BAILEY L.G., BAUM B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular. Biology. Rep.* 15: 8-15.

PURSEGLOVE J.W. 1972. Tropical crops. In: *Monocotyledons* I. Longman, London.P. 58-75

RAMIREZ R.1992. Curvas de absorción y crecimiento en dos aráceas comestibles (*Xanthosoma sagittifolium* y *Xanthosoma Violaceum*). Tesis presentada para optar al título de Licenciado en ingeniería agronómica con énfasis en fitotecnia. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

REYES G., RÖNNBERGWÄSTLJUNGY AC., NYMAN M. 2006. Comparison in field performance between DMV- free and DMV- infected *in vitro* plants of cocoyam (*Xanthosoma* sp.) in Nicaragua. Tesis para grado de doctorado, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.

RODRÍGUEZ. 2007. Planificación de la agro-cadena de tiquizque en la región central sur de Costa Rica. Ministerio de agricultura y ganadería.

SABORÍO F. 2004. Breeding of neglected and under-utilized crops, spices and herbs, Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schoot). Science Publishers. Cap. 11. Pag.170-187p.

SABORIO F.,UMANA G., URENA G., MUNOZ G., TORRES S., VALERIN A.T.,VALVERDE R.2004.Inductin of genetic variation in *Xanthosoma* spp. In: Genetic improvement of under-utilized and neglected crops in low income food deficit countries through irradiation and related techniques. (Eds. International Atomic Energy Agency).Vienna, Austria, pp. 143-154.

SCHILLING A.G., MOLLER E.M., GEIGER H.H. 1996. Polymerase chain reaction-bases- assay for species- specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. Phytopathology 86: 515-522.

TAMBONG J.T., ACHUO A. E. 1997. *In vitro* growth suppression of the cocoyam root rot pathogen *Pythium myriotylum* by *Pseudomonas aeruginosa*. Tropical Science 37:183-188.

TAMBONG J. T., SAPRA V. T., GARTON S. 1998. *In vitro* induction of tetraploids in colchicines-treated cocoyam plantlets. Euphytica 104:191-1997.

TAMBONG J.T., POPPE J., HÖFTE M. 1999. Pathogenicity, electrophoretic characterisation and *in planta* detection of the cocoyam root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. European Journal of Plant Pathology 105:597-607.

TAMBONG J.T., HÖFTE M. 2001. Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA 1. European Journal of Plant Pathology 107: 511 – 521.

TEMGO T.J., BOYOMO O. 2002. Variations in the phenolic contents of cocoyam clones in correlation to resistance to *Pythium myriotylum*. Biology Plantarum 45 (3): 433 – 436.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. 1997. Clustal-X, software for Power PC. Heidelberg European Molecular Biology Organization.

TORRES S., GÓMEZL., SABORÍOF., VALVERDER. 2000. Comportamiento en el campo de siete genotipos de tiquizque (*Xanthosoma* spp.) propagados *in vitro*. Agronomía Costarricense 24: 7-17.

VALVERDE R., GÓMEZ L., SABORÍO F., TORRES S., ARIAS O., THORPE T. 1997. Field evaluation of Dasheen Mosaic Virus-free cocoyam plants produced by *in vitro* techniques. *Scientia Horticulturae* 68:37-47

VAN DER PLAATS-NITERINK AJ.1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21. BaarnmNetherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures.

VILLA N., KAGEYAMAK, SUGA H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS, rDNA, cytochrome oxidase II and β - tubulin gene sequences. *Mycological* 98 (3): 410-422.

WANG P.H., CHUNG C Y., LIN Y.S., Yeh Y. 2003. Use of polymerase chain reaction to detect the soft rot pathogen, *Pythium myriotylum*, in infected ginger rhizomes. *Letters in Applied Microbiology* 36: 116 – 120.

WUTOH J.G., TAMBONG J.T., MEBOKA M., NZIETCHUENG S. 1994. Field evaluation of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) for tolerance to the root rot disease caused by *Pythium myriotylum*. *Acta Horticulture* 380p

WILSON J.E. 1984. Cocoyam. In: *The Physiology of Tropical Field Crop*. (Eds. P.R. Goldsworthy, & N. M. Fisher). John Wiley and Sons Ltd. New York, London, pp. 589-605

CAPITULO II

**EVIDENCIA FILOGENÉTICA DE ESPECIFICIDAD POR
HOSPEDERO EN *PYTHIUM MYRIOTYLUM*, AGENTE CAUSAL DEL
MAL SECO EN TIQUIZQUE.**

1. RESUMEN

Pythium myriotylum, agente causal del Mal Seco en tiquizque (*Xanthosoma sagittifolium*), es considerado el patógeno más destructivo de este cultivo. En Costa Rica, Puerto Rico y Camerún se reportan pérdidas de hasta un 90% debido a la enfermedad. Estudios patológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares de distintos aislamientos de *P. myriotylum*, han revelado evidencias de que los aislamientos obtenidos de tiquizque muestran diferencias con los demás aislamientos de otros hospederos. El objetivo de este estudio fue investigar más a fondo la variación molecular por primera vez con los genes mitocondriales de la citocromo oxidasa (COXI, COXII) y el gen nuclear β -tubulina. Treinta y dos secuencias de los genes mitocondriales COX I, COX II, y del gen nuclear β -tubulina, de aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos a tiquizque fueron generadas con el Bigdye Terminator v3.0 en un secuenciador ABI 3100-Avant automatizado. Posteriormente se generaron árboles filogenéticos con el criterio de máxima parsimonia y máxima verisimilitud disponibles en el programa PAUP * 4.0b10. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de otros aislamientos de *P. myriotylum*, y otras especies de *Pythium* provenientes del GenBank (NCBI). Los alineamientos de secuencias de los tres genes revelaron varias sustituciones transicionales entre los aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos a tiquizque y los no patogénicos. El análisis de los árboles generados mediante máxima parsimonia y máxima verisimilitud de los tres genes, agrupó a los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque en un grupo único, diferente al

de los aislamientos provenientes de otras especies. Constituye esta una evidencia más de la especialización por hospedero de los aislamientos provenientes de tiquizque.

2. INTRODUCCIÓN

El tiquizque o cocoyam (*Xanthosoma sp.*) es una planta herbácea de la familia Araceae, cuyos cormos son parte de la dieta básica de aproximadamente 200 millones de personas en países de toda la franja tropical en Asia, África y América (Tambong *et al.*, 1999).

El cultivo del tiquizque se ve afectado principalmente por dos enfermedades, el Virus del Mosaico de la Malanga (DsMV) y el Mal Seco. El Mal Seco conocido también en inglés como cocoyam root rot blight, dry root rot, o Apolo disease (Saborío, 2004), es causado por *P. myriotylum* Drechs (Pacumbaba *et al.*, 1992; Tambong *et al.*, 1999).

Pythium myriotylum es un patógeno de suelo con distribución mundial, aunque con predominio en los trópicos y subtrópicos (Waterhouse y Waterston, 1966). Este patógeno causa daños en raíces y semillas en una gran variedad de cultivos que incluyen, jengibre (Wang *et al.*, 2003), frijol (Reeleder y Hagedorn, 1981), tomate, tabaco, sandía (Waterhouse y Waterston, 1966), caladium, papaya, coníferas, fresa, papa, pepino y maní (Bell y Minton, 1973). La temperatura óptima para su crecimiento está entre los 30 a 35 °C, lo que implica un ámbito estrecho; pero puede soportar temperaturas que van de los 10 °C a los 44 °C (Waterhouse y Waterston, 1966). Además, *Pythium myriotylum* tolera una

gran gama de niveles de humedad del suelo. Su prevalencia ecogeográfica y el extenso ámbito de hospederos, indica que los aislamientos de *P.myriotylum* podrían mostrar un cierto grado de variación genética.

Aunque la clasificación de *P.myriotylum* está bien establecida, poco se sabe acerca de las posibles variaciones genéticas dentro de esta especie. La primera prueba de variabilidad intraespecífica en *P.myriotylum* fue observada por McCarter y Littrell (1968), quien encontró una variación en el grado de virulencia en plantas de tomate, centeno y avena. Bell y Minton (1973) indicaron diferencias en el tiempo de aparición de síntomas entre tres aislamientos de *P. myriotylum* de maní.

En 1999, Tambong *et al.* observaron importantes variaciones bioquímicas y fisiológicas entre los aislamientos *P. myriotylum* provenientes de raíces enfermas de tiquizque y aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de otras plantas. Ellos demostraron mediante análisis isoenzimáticos y pruebas de patogenicidad que los aislamientos provenientes de tiquizque no tenían una amplia gama de hospederos y propusieron la hipótesis de que estos aislamientos han desarrollado cierto grado de especialización por hospedero.

En el 2006, Perneel *et al.* estudiaron la variabilidad intraespecífica entre los aislamientos patogénicos a tiquizque y los no patogénicos. Analizaron la temperatura óptima de crecimiento y determinaron que los aislamientos patogénicos crecían bien a 28 °C y no a 37°C, como sí lo hacen los aislamientos típicos de *P.myriotylum*. A nivel molecular, mediante marcadores moleculares (AFLP), lograron distinguir las especies

patogénicas de las no patogénicas. Los alineamientos de la región ITS (Internal Transcribed Spacer), de los aislamientos de tiquizque mostraron 99,1% de homología con los aislamientos de *P.myriotylum* de otros hospederos, solamente se detectó una sustitución de bases (adenina por guanina) en la posición 824(bp) de esta región.

En el 2011, Gómez *et al.* encontraron otra sustitución de bases (citosina- timina) en las secuencias del ITS en la posición 853, este polimorfismo de nucleótido simple coincide con un sitio de restricción de la enzima *AarI*, que permite diferenciar los aislamientos patogénicos a tiquizque de los no patogénicos a través de la técnica del PCR-RFLP(Restriction fragment length polymorphism).

Adicionalmente, cuando se enviaron aislamientos de *P. myriotylum* patogénico a tiquizque de Costa Rica al Fungal Biodiversity Centre en Holanda para su identificación, el reporte clasificó a las cepas patogénicas como *Pythium* aff. *myriotylum*, lo que indicaba que estas se distinguían morfológicamente de las cepas comunes de *P. myriotylum*.

Los avances recientes en los métodos moleculares han permitido el estudio más objetivo de las relaciones filogenéticas entre los hongos. Por ejemplo, los análisis filogenéticos basados en el uso de genes múltiples son ampliamente utilizados para identificar, especies y poblaciones. Entre los genes que se han utilizado están el ITS, LSU (Large Subunit), la β -tubulina, el citocromo oxidasa I y el citocromo oxidasa II (Garzón *et al.*, 2007; Kageyama *et al.*, 2005; Martin, 2000). Por otra parte, la concordancia genealógica entre genes nucleares y mitocondriales es muy usada para establecer nuevas especies (Couch y Khon, 2002). Esta técnica asocia a especies con características ecológicas similares y refleja la influencia de los mismos factores evolutivos. Este

concepto fue utilizado por Couch y Khon, (2002) para definir una nueva especie del género *Magnaporthe*, *M. oryzae* asociada a *Oryza sativa*.

El objetivo de este estudio fue investigar más a fondo esta variación molecular entre los aislamientos de *Pythium myriotylum* patogénicos a tiquizque, los no patogénicos a tiquizque y otras especies de *Pythium* mediante el análisis múltiple y la concordancia genealógica de los genes mitocondriales (COXI y COXII) y el gen nuclear de la β -tubulina.

3. METODOLOGÍA

3.1. Aislamientos

Se utilizaron 29 aislamientos de *P.myriotylum* y 130 secuencias de otras especies de *Pythium* obtenidas en el banco de genes (Gene Bank) (Cuadro 1) y a *Phytophthora* como grupo externo (out group)

Los aislamientos de *P. myriotylum* se obtuvieron de raíces infectadas de tiquizque, de plantas provenientes de Costa Rica y Camerún. Los aislamientos de Camerun, fueron solicitados a Dr. Tambong Los cultivos se conservan en el LBP (Laboratorio de Biotecnología) en medio PARC (Corn meal agar + Pimaricina +Riframpicina + Ampicilina).

Para la obtención de micelio, se colocó un trozo de agar del medio de cultivo PARC de cada aislamiento en tubos de microcentrífuga de 1,7 ml, con medio V8 líquido al 20% (100 ml de jugo V8, 1 g de CaCO₃, 400 ml de agua destilada). Los tubos fueron colocados durante seis días a 28 °C, en la oscuridad y se mantuvieron con agitación constante.

Cuadro 1. Lista de especies de *Pythium* y *Phytophthora* usadas en este estudio Cuadro 1.

Especie	Hospedero	Origen	Gene Bank		
			CoxI	Cox II	β- tubulina
<i>P. acrogynum</i>	*	China	EU350528	-	-
<i>P. acanthophoron</i>	*	Hawái	EU350529	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	<i>Lactuca sativa</i>	México	AY129164	-	-
<i>P. aphanidermatum</i>	Lechuga	México	-	AF196579	-
<i>P. aphanidermatum</i>	Papaya, JWH 1522	Hawái	-	AF196580	-
<i>P. aphanidermatum</i>	JWH 1463	Japón	-	AF196581	-
<i>P. aphanidermatum</i>	Espinaca, JWH 1448	Japón	-	AF196582	-
<i>P. aphanidermatum</i>	JWH 1502	Corea	-	AF196583	-
<i>P. aphanidermatum</i>	WJB Py 52	Sur África	-	AF196584	-
<i>P. aphanidermatum</i>	Suelo	Florida	-	AF196585	-
<i>P. aphanidermatum</i>	Bentgrass	Corea	-	-	DQ071295
<i>P. aphanidermatum</i>	Zanahoria	Gifu	-	-	DQ071296
<i>P. aristosporum</i>	Trigo	Saskatchewan	-	-	DQ071297
<i>P. aristosporum</i>	Bentgrass	New York	-	-	DQ071298
<i>P. arrethenomanes</i>	Zoysia grass	Hyogo	-	-	DQ071299
<i>P. arrethenomanes</i>	Caña de Azúcar	Luisiana	-	-	DQ071301
<i>P. arrethenomanes</i>	Caña de Azúcar	Luisiana	-	-	DQ071302
<i>P. arrethenomanes</i>	Arroz	Australia	-	AF196586	-
<i>P. arrethenomanes</i>	césped	New York	-	AF196587	-
<i>P. buismaniae</i>	*	Países bajos	EU350527	-	-
<i>P. boreale</i>	*		EF408872	-	-
<i>P. catenulatum</i>	Suelo	India	-	AF196588	-
<i>P. catenulatum</i>	Zoysia grass	Gifu	-	-	DQ071303
<i>P. deliense</i>	MES # 4	Arizona	-	AF196589	-
<i>P. deliense</i>	Calabaza	Okinawa	-	-	DQ071305
<i>P. dissotocum</i>	Suelo	Gifu	-	-	DQ071306
<i>P. echinulatum</i>	*	Australia	EU350526	-	-
<i>P. graminicola</i>	Suelo	Kumamoto	-	-	DQ071307
<i>P. graminicola</i>	Suelo	Kumamoto	-	-	DQ071309
<i>P. graminicola</i>	*	Florida	-	AF196590	-
<i>P. graminicola</i>	JWH 1422	Japón	-	AF196591	-
<i>P. graminicola</i>	JWH 1419	Japón	-	AF196592	-
<i>P. graminicola</i>	Caña de Azúcar	Jamaica	-	AF196593	-
<i>P. graminicola</i>	Suelo	Komamoto	-	AB160849	-
<i>P. helicoides</i>	Frijol	USA	-	-	DQ071310
<i>P. helicoides</i>	Rosa	Gifu	-	-	DQ071311
<i>P. heterothallicum</i>	Suelo	Canadá	-	AF196594	-
<i>P. heterothallicum</i>	Suelo	Canadá	-	AF196595	-
<i>P. hydnosporum</i>	Suelo	Fukuoka	-	-	DQ071312
<i>P. inflatum</i>	Frijol	Fukuoka	-	-	DQ071313
<i>P. insidiosum</i>	Caballo	Nueva guinea	-	AF196596	-
<i>P. insidiosum</i>	Caballo	Costa Rica	-	AF196597	-
<i>P. intermedium</i>	Suelo	Hokkaido	-	-	DQ071314
<i>P. irregulare</i>	Frijol	Hokkaido	-	-	DQ071315
<i>P. irregulare</i>	Zanahoria	Gifu	-	-	DQ071316
<i>P. irregulare</i>	Suelo	Kanagawa	-	-	DQ071318
<i>P. irregulare</i>	Suelo	Florida	-	AF196598	-
<i>P. irregulare</i>	Trigo	Washington	-	AF196599	-
<i>P. irregulare</i>	Trébol	Mississippi	-	AF196600	-
<i>P. irregulare</i>	JWH 1439	Japón	-	AF196601	-
<i>P. irregulare</i>	ginsén	Corea	-	AF196602	-
<i>P. iwagamae</i>	Trigo	Japón	-	AF196603	-
<i>P. jasmonium</i>	Arabidopsis	Japón	EU350524	-	-
<i>P. jasmonium</i>	Arabidopsis	Japón	EU350525	-	-
<i>P. mamillatum</i>	Rododendro	California	-	AF196604	-
<i>P. mamillatum</i>	Caña de Azúcar	Hokkaido	-	-	DQ071320
<i>P. matophorum</i>	*	Inglaterra	EU350523	-	-
<i>P. myriophyllum</i>	*	Florida	-	AF196605	-
<i>P. myriophyllum</i>	Caña de Azúcar	Australia	-	AF196606	-
<i>P. myriophyllum</i>	Judía verde	Arizona	-	AF196607	-

Cuadro 1. Lista de especies de *Pythium* y *Phytophthora* usadas en este estudio.

Especie	Hospedero	Origen	Gene Bank		
			CoxI	Cox II	β - tubulina
<i>P. myriotylum</i>	Pinna	Australia		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i>	Frijol	Malasia		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i>	Maní	Texas		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i>	Espinaca	Osaka	-	-	DQ071322
<i>P. myriotylum</i>	Frijol	Hokkaido	-	-	DQ071323
<i>P. myriotylum</i> (CMR2)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR3)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR4)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR5)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR7)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR8)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR9)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR10)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR11)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR12)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR16)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR18)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR22)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CMR25)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (BOKWA1)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR1)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR2)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR3)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR4)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR6)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR7)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR9)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR10)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. myriotylum</i> (CR11)	Tiquizque	Costa Rica		Este estudio	
<i>P. nun</i>	Suelo	Florida	-	AF196609	-
<i>P. nun</i>	Suelo	Colorado	-	-	DQ071325
<i>P. nun</i>	*	USA	EU350522	-	-
<i>P. oedochilum</i>	*	*	EF408873	-	-
<i>P. oedochilum</i>	Suelo	Países bajos	-	-	DQ071326
<i>P. oedochilum</i>	Suelo	Países bajos	-	-	DQ071327
<i>P. oligandrum</i>	<i>Phlox paniculata</i>	Mie	-	-	DQ071328
<i>P. oligandrum</i>	Remolacha	Remolacha	-	AF196611	-
<i>P. oligandrum</i>	Trigo	Sur África	-	AF196612	-
<i>P. orthogonon</i>	*	Libano	EU350521	-	-
<i>P. orthogonon</i>	Zoysia grass	Gifu	-	-	DQ071329
<i>P. ostracoles</i>	*	*	EF408874	-	-
<i>P. oopapillum</i>	*	Canadá	FJ655181	-	-
<i>P. paroccandrium</i>	Suelo	Australia	-	-	DQ071332
<i>P. paddicum</i>	Cebada	Fukui	-	-	DQ071331
<i>P. paddicum</i>	Trigo	Japón	-	AF196613	-
<i>P. pulchrum</i>	*	Ohio	-	AF196614	-
<i>P. periplocum</i>	Zoysia grass	Gifu	-	-	DQ071333
<i>P. pyriforme</i>	Bentgrass	Osaka	-	-	DQ071334
<i>P. recalcitrans</i>	*	Sur África	EF426550	-	-
<i>P. recalcitrans</i>	*	Sur África	EF426551	-	-
<i>P. recalcitrans</i>	*	Sur África	EF426552	-	-
<i>P. rostratum</i>	Bentgrass	Gifu	-	-	DQ071335
<i>P. rostratum</i>	Arroz	Australia	-	AF196615	-
<i>P. spinosum</i>	Zanahoria	Gifu	-	-	DQ071336
<i>P. spinosum</i>	Suelo	Florida	-	AF196616	-
<i>P. spinosum</i>	JWH 1499	Corea	-	AF196617	-
<i>P. splendens</i>	*	Florida	-	AF196618	-
<i>P. splendens</i>	WJB PY56	Sur África	-	AF196619	-
<i>P. splendens</i> (CMR19)	Tiquizque	Camerún		Este estudio	
<i>P. strictum</i>	*	Polonia	EF406093	-	-
<i>P. sulcatum</i>	Zanahoria	Florida	-	AF196620	-
<i>P. sulcatum</i>	Zanahoria	Gifu	-	-	DQ071337

Cuadro 1. Lista de especies de *Pythium* y *Phytophthora* usadas en este estudio.

Especie	Hospedero	Origen	Gene Bank		
			CoxI	Cox II	β - tubulina
<i>P.sylvaticum</i>	Suelo	Tennessee1	-	AF196621	-
<i>P.sylvaticum</i>	Suelo	Tennessee2	-	AF196622	-
<i>P.sylvaticum</i>	Maíz	Iowa	-	AF196623	-
<i>P.sylvaticum</i>	Suelo	Kenia	-	AF196624	-
<i>P.sylvaticum</i>	Frijol	Vancouver	-	AF196625	-
<i>P.sylvaticum</i>	Zanahoria	Gifu	-	-	DQ071338
<i>P.torulorum</i>	Zoysia grass	Hyogo	-	-	DQ071339
<i>P.torulorum</i>	Suelo	Gifu	-	-	DQ071340
<i>P.torulorum</i>	Bentgrass	New York	-	-	DQ071341
<i>P.torulorum</i>	*	Ohio	-	AF196626	-
<i>P.torulorum</i>	JWH 7-2	Luisiana	-	AF196627	-
<i>P.torulorum</i>	Trufas	New York	-	AF196628	-
<i>P.uncinulatum</i>	*	Países bajos	EU350530	-	-
<i>P.ultimum</i>	Remolacha	Hokkaido	-	-	DQ071342
<i>P.ultimum</i>	Suelo	Florida	-	AF196629	-
<i>P.ultimum</i>	*	Washington	-	AF196630	-
<i>P.ultimum</i>	Frijol	New York	-	AF196631	-
<i>P.ultimum</i>	Cítricos	Nueva Zelanda	-	AF196632	-
<i>P.ultimum</i>	Hawái	Protea	-	AF196633	-
<i>P.ultimum</i>	ginsén	Corea	-	AF196634	-
<i>P.ultimum</i>	Rosa canina	Polonia	-	AF196635	-
<i>P.vanterpoolii</i>	Bentgrass	Corea	-	-	DQ071343
<i>P.vanterpoolii</i>	Bentgrass	New York	-	-	DQ071344
<i>P.vanterpoolii</i>	Zoysia grass	Japón	-	-	DQ071345
<i>P.violae</i>	Pansy	Totori	-	-	DQ071347
<i>P.volutum</i>	Trigo	Fukui	-	-	DQ071348
<i>P.vexans</i>	Suelo	Gifu	-	-	DQ71304
<i>P.vexans</i>	Zoysia grass	Gifu	-	-	DQ71321
<i>P.zingiberum</i>	Jengibre	Wakayama	-	-	DQ071349
<i>Phytophthora citricola</i>	<i>Estoma grandiflora</i>	Chiba	-	-	DQ071356
<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Cucumis sativus</i>	USA	-	-	EF617439
<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Capsicum annum</i>	Florida	AY129166	-	-
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Solanum demissum</i>	México	AY129165	-	-
<i>Phytophthora megasperma</i>	<i>Prunus sp</i>	USA	-	-	AY129212
<i>Phytophthora mirabilis</i>	<i>Mirabilis jalapa</i>	México	AY129171	-	-
<i>Phytophthora ramorum</i>	Roble	USA	DQ117985	-	-
<i>Phytophthora ramorum</i>	Roble	USA	DQ117986	-	-
<i>Phytophthora ramorum</i>	Roble	USA	-	-	EU850955

3.2 Extracción de ADN

El ADN de *Pythium* sp. se extrajo a partir de micelio del hongo cultivado en medio V8 al 20% (descripción en sección 2.1), por el método CTAB modificado de Murray y Thompson (1980) y Porebsky *et al.* (1997). Primero se centrifugó el micelio para eliminar el medio de cultivo. Se descartó el sobrenadante y se agregó al precipitado 150 μ l de buffer de extracción [(100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8), 1.4 M NaCl)]. El tejido se maceró por 3 min con un pistilo hasta obtener una fase homogénea. Se agregó 150 μ l de buffer CTAB [(2% CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8), 1.4 M NaCl)] y se volvió a macerar, posteriormente se incubó a 67 $^{\circ}$ C por 1 h. Después de la incubación, se agregó un volumen de 300 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión. La mezcla fue centrifugada a 12000 rpm por 15 min. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se repitió el tratamiento con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Luego se agregó 20 μ l de acetato de sodio y 300 μ l de isopropanol frío y se incubó durante 12 h a -20 $^{\circ}$ C. Al concluir el periodo de incubación se centrifugó a 13000 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 150 μ l de etanol al 70 %. El pellet se secó en una cámara de flujo laminar y fue resuspendido en 50 μ l de agua nano pura estéril. El ADN obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro BECKMAN DU 530, y posteriormente se almacenó a -20 $^{\circ}$ C.

Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación.

Esta parte de la metodología se realiza en el Ministerio de agricultura en Canadá (Agriculture and Agri-Food Canadá) por un convenio entre la Universidad de Costa Rica y este Ministerio.

Se secuenció la región COXI, COX II y β -Tubulina de 32 aislamientos de *Pythium* provenientes de la colección de aislamientos del LBP (Laboratorio de Biotecnología de plantas).

Se utilizaron los imprimadores FM58 (5' CCACAAATTTCACTACATTGA3') FM66 (5'TAGGATTTCAAGATCCTGC3'), que fueron obtenidos del gen COXII de *Phytophthora megasperma* (Martín, 2000) para la secuenciación y amplificación del COXII; los imprimadores FM55(5DGGCATAACCAGCTAAACCTAA3'), FM59(5'DTTTATGGTCAATGTAGTGAAA3) (Martin, 2000) para la secuenciación y amplificación de COX I y los imprimadores BT5 (5'GTATCATGTGCACGTACRCGG3') y BT6 (5'CAAGAAAGCC TTACGACGGA), que fueron obtenidos mediante el alineamiento del gen de la β - tubulina de *Pythium ultimum* y de *Phytophthora cinnamoni* (Villa *et al*, 2006), para la amplificación y secuenciación de la β tubulina. La reacción de amplificación consistió en 1 μ l de 10x Buffer (*Taq* Titanium Buffer, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, Canadá), 0.50 μ l de dNTP (0.1 mM), 0.04 μ l de cada imprimador (0.008 μ M), 0.10 μ l *Taq* ADN polimerasa (0.50 X/10 μ LTitanium/ultra therm. BD Biosciences Clontech, Palo Alto, Canadá), 7.32 μ l agua nano pura y 1 μ l de ADN. Los

ciclos térmicos utilizados para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, una temperatura de anillado de 52 °C para el COXII, 55 °C para el COXI y 66 °C para la β tubulina por 1 min y una elongación a 72 °C por 2 min; luego de los 40 ciclos un período de elongación a 72 °C por 10 minutos, los cuales se llevaron a cabo en un termociclador Genius Thermal Cycler (Techne Ltd, Cambridge, UK). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis, en geles de agarosa (UAB, Life Sciences, Lithuania) al 1,6 % (w/v) con buffer 0,5 x tris-buffer (TBE) y 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. La visualización de los fragmentos se realizó con luz ultravioleta (uv).

Para la secuenciación de los productos de PCR se utilizó el kit ABI BigDye Terminator Chemistry v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo al protocolo del fabricante, la reacción se llevo a cabo en un secuenciador ABI 3100-Avant (Applied Biosystems Hitachi, Japón) del laboratorio del Ministerio de Agricultura de Canadá.

3.3 Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético

Además de los 32 aislamientos secuenciados, se utilizaron secuencias de referencia, provenientes del Gene Bank de *P. myriotylum* y de otras especies de *Pythium*, para un total de 82 secuencias del COX II, 26 secuencias para el COX I y 66 para la β tubulina (Cuadro1). Las secuencias se importaron al programa BioEdit (Hall, 1999) y se cortaron las terminaciones 5' y 3' de las cadenas para facilitar el alineamiento. La longitud de las secuencias analizadas fue de 540 pares de bases para el COXII, 680 pares de bases para el

COXI y 560 pares de bases para la β tubulina. Se generaron alineamientos preliminares de las matrices con CLUSTAL W ver.1.60 (Thompson *et al.*, 1997).

El análisis de reconstrucción filogenética se llevo a cabo con máxima-parsimonia (MP) y máxima verisimilitud (“Maximun-likelihood”), a través de una búsqueda heurística con los parámetros obtenidos en el model test. El modelo que más se ajustó para los tres genes fue GTR+G+I (General time reversible nucleotide substitution model with gamma-distributed rate variation and a proportion of invariable sites), disponible en el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002).

Se realizó un análisis filogenético de “bootstrap” de 1000 replicaciones para evaluar los nodos de los respectivos árboles filogenéticos, para cada árbol se definió su raíz con el criterio de grupos extremos (“out-group”) utilizando a *Phytophthora*.

4. RESULTADOS

Para el alineamiento del gen de la β -tubulina se utilizó un total de 481 caracteres para el análisis. de estos caracteres 171 son parsimoniosamente informativos, 19 son variables y parsimoniosamente no informativos y 394 son constantes. El análisis de los cuatro árboles igualmente parsimoniosos del gen de la β -tubulina delimita dos grupos en los aislamientos de *P. myriotylum* (Figura 1): uno conformado por los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque, tanto de Costa Rica como de Camerún, y otro constituido por los aislamiento de *P. myriotylum* de otros hospederos. El grupo conformado por los aislamientos provenientes de tiquizque es respaldado por

un valor de “bootstrap” de 91%, mientras que el grupo conformado por los aislamientos de *P.myriotylum* provenientes de otros hospederos es respaldado por un valor de 86%.

El análisis de máxima verisimilitud muestra una situación similar (Figura 2), los aislamientos de *P.myriotylum* provenientes de tiquizque son respaldados por un valor de “bootstrap” de 89 % y forman un grupo diferente los aislamientos de *P. myriotylum* de otros hospederos respaldados por un valor de 100 %.

El alineamiento múltiple de las secuencias muestra 5 sustituciones transicionales (G-A; T-C), entre los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque y los aislamientos de *P.myriotylum* de otros hospederos.

El alineamiento del gen COX-I, utilizó un total de 626 caracteres para el análisis, de estos 360 son parsimoniosamente informativos, 17 son variables y parsimoniosamente no informativos y 249 son constantes. Los 15 árboles igualmente parsimoniosos obtenidos del análisis del gen COX-I, separa a los aislamientos de *P. myriotylum* en dos grupos, el primer grupo lo constituyen los aislamientos de *P.myriotylum* (Figura 3) de otros hospederos, respaldados con un valor de “bootstrap” de 97% y otro grupo que corresponde a los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque, tanto de Costa Rica como de Camerún, respaldado por un valor de bootstrap (100%.)

El análisis de máxima verisimilitud muestra una situación similar (Figura 4), los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de otros hospederos forman un grupo diferente, respaldado por un valor de “bootstrap” de 96%, del grupo de aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque respaldado por un valor de bootstrap de 89%. Ninguno de los aislamientos de tiquizque provenientes de Costa Rica o Camerún se

agrupa con los aislamientos de *P.myriotylum* de otros hospederos o regiones geográficas.

El alineamiento múltiple de las secuencias muestra 3 sustituciones transicionales (G-A; T-C), entre los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque y los aislamientos de *P. myriotylum* de otros hospederos.

El alineamiento del gen COX-II utilizó un total de 530 caracteres para el análisis. De estos 144 son parsimoniosamente informativos, 31 son variables y parsimoniosamente no informativos y 355 son constantes. El análisis de los 23 árboles igualmente parsimoniosos del gen delimitan dos grupos en los aislamientos de *P. myriotylum*, el primer grupo formado por los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque provenientes tanto de Costa Rica como de Camerún respaldado por un valor de bootstrap de 97% y (Figura 5) el otro grupo que corresponde a los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de otros hospederos respaldado por un valor de bootstrap de 100% (Figura 5).

El análisis de máxima verisimilitud muestra una situación similar (Figura 6), los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque forman un grupo, respaldado por un valor de “bootstrap” de 99%, mientras que los aislamientos de *P.myriotylum* de otros hospederos forman otro grupo respaldado por un valor de bootstrap de 99%.

El alineamiento múltiple de las secuencias muestra 7 sustituciones transicionales (G-A; T-C) entre los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque y los aislamientos de *P. myriotylum* de otros hospederos.

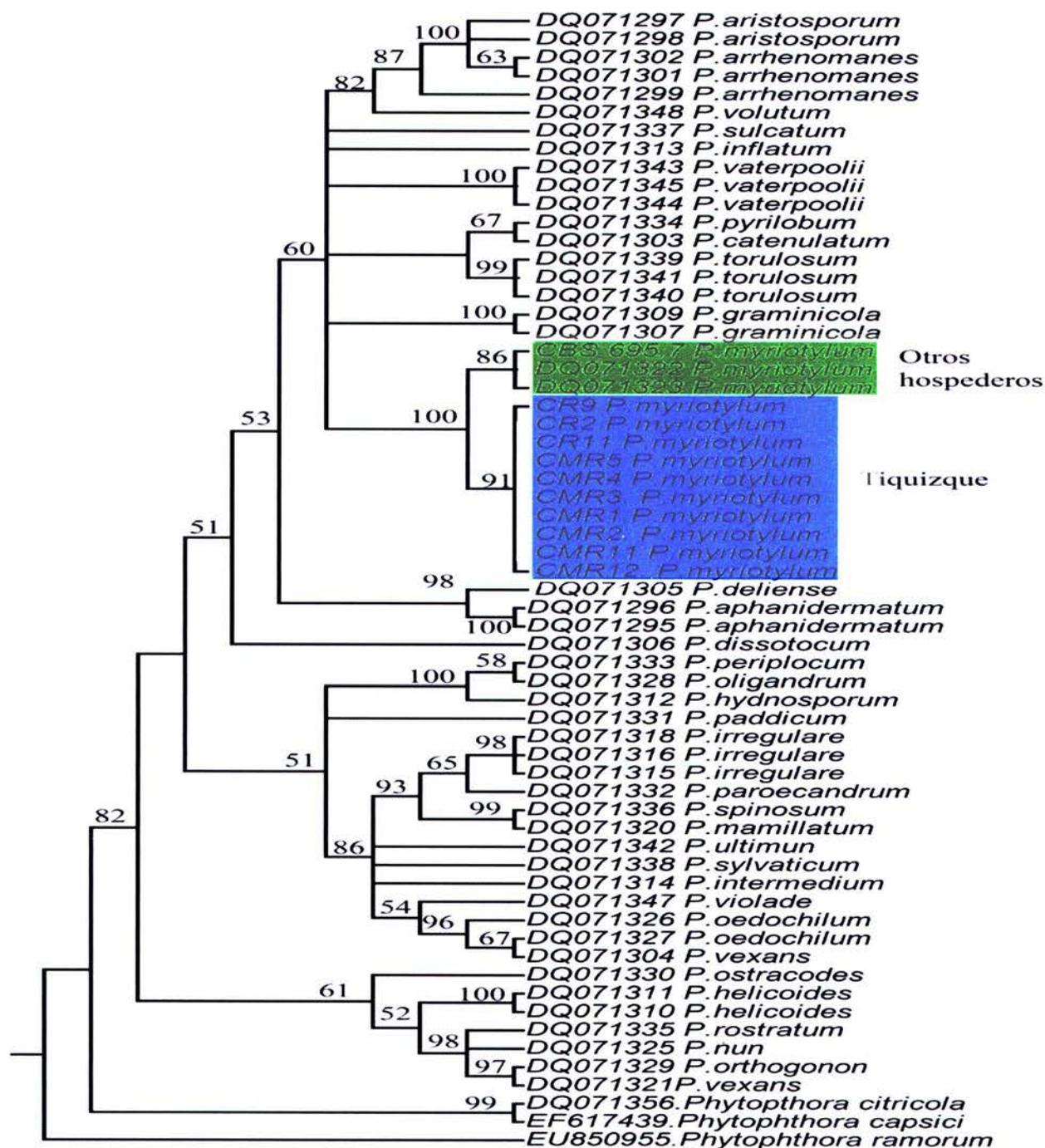


Figura 1. Uno de los 4 árboles más parsimoniosos determinados a partir de secuencias del gen β - tubulina de los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*. En la figura se muestran los valores del "bootstrap" (>%50) basados en 1000 replicaciones. TL=868; CI=0.333; RI=0.788; RC=0.262; HI=0.667.

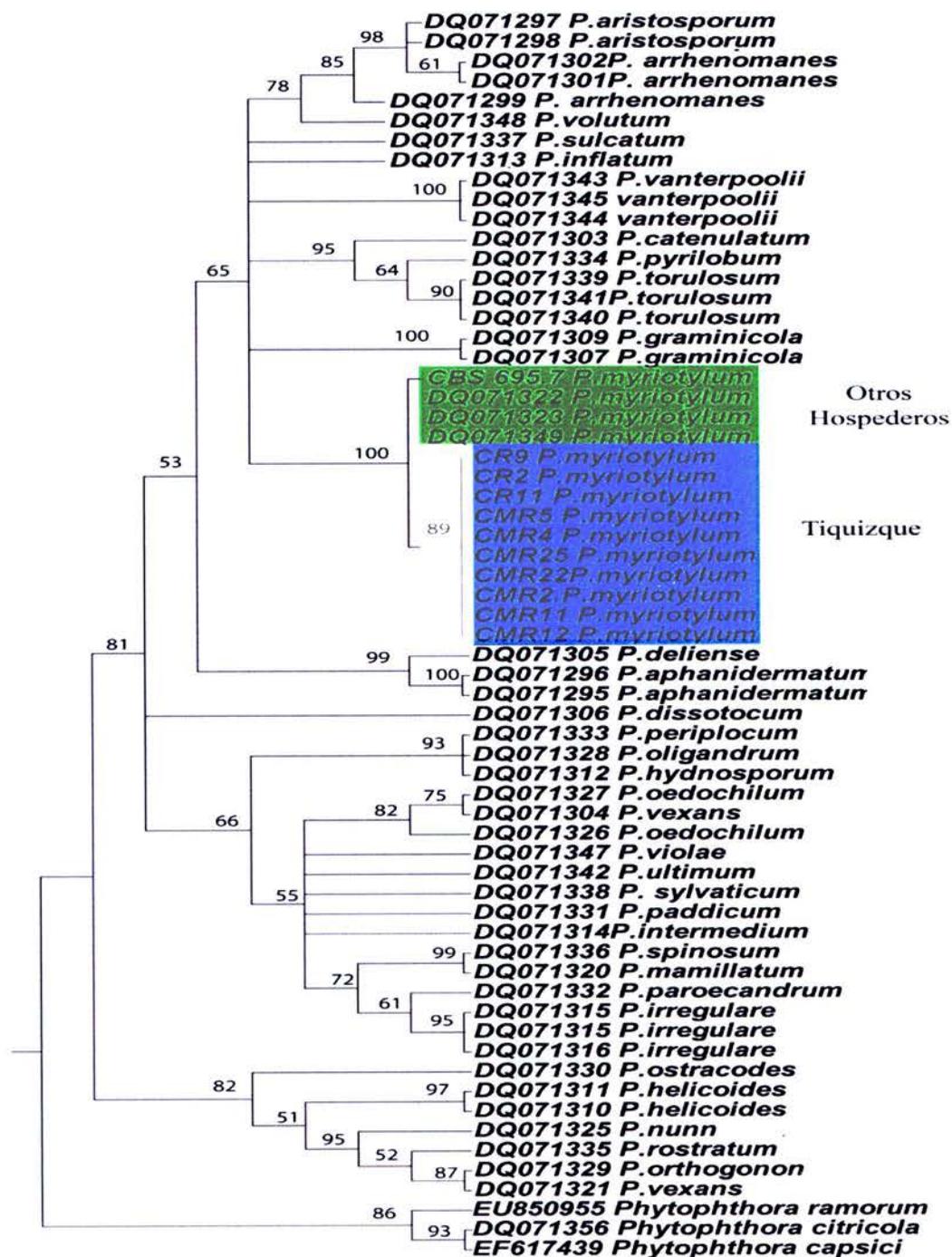


Figura 2. Árbol consenso obtenido mediante el análisis de máxima verisimilitud a partir de las secuencias del gen β - tubulina de los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*. En la figura se muestran los valores del "bootstrap" (>%50) obtenidos mediante una búsqueda heurística de 1000 replicaciones. TL=851; CI=0.340; RI=0.794; RC=0.270, HI=0.660

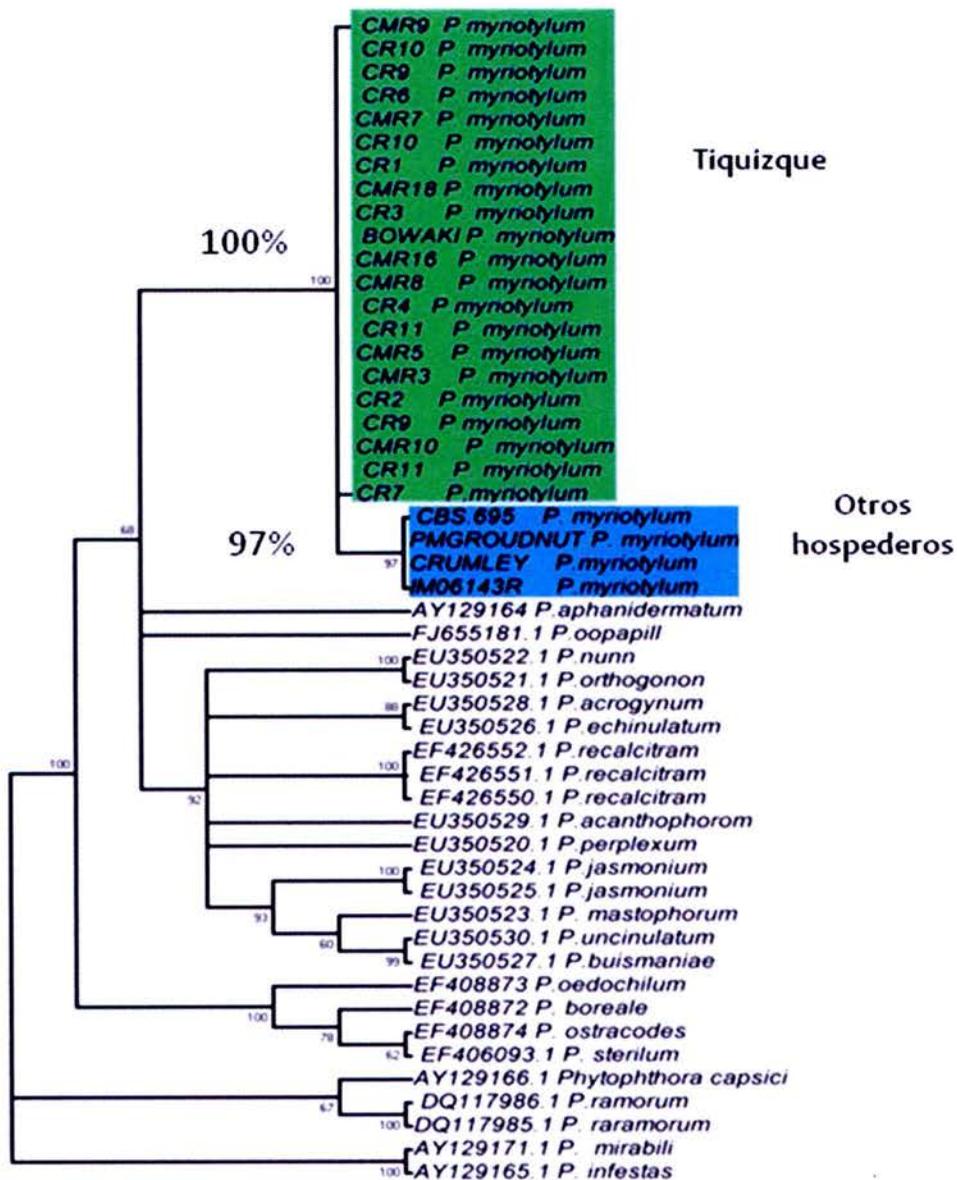


Figura 3. Uno de los 16 árboles más parsimoniosos determinados a partir de secuencias del gen citocromo oxidasa uno (COXI) de los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*. En la figura se muestran los valores del “bootstrap” (>%50) basados en 1000 replicaciones. TL=690; CI=0.687; RI=0.890; RCI=0.612 HI=313.

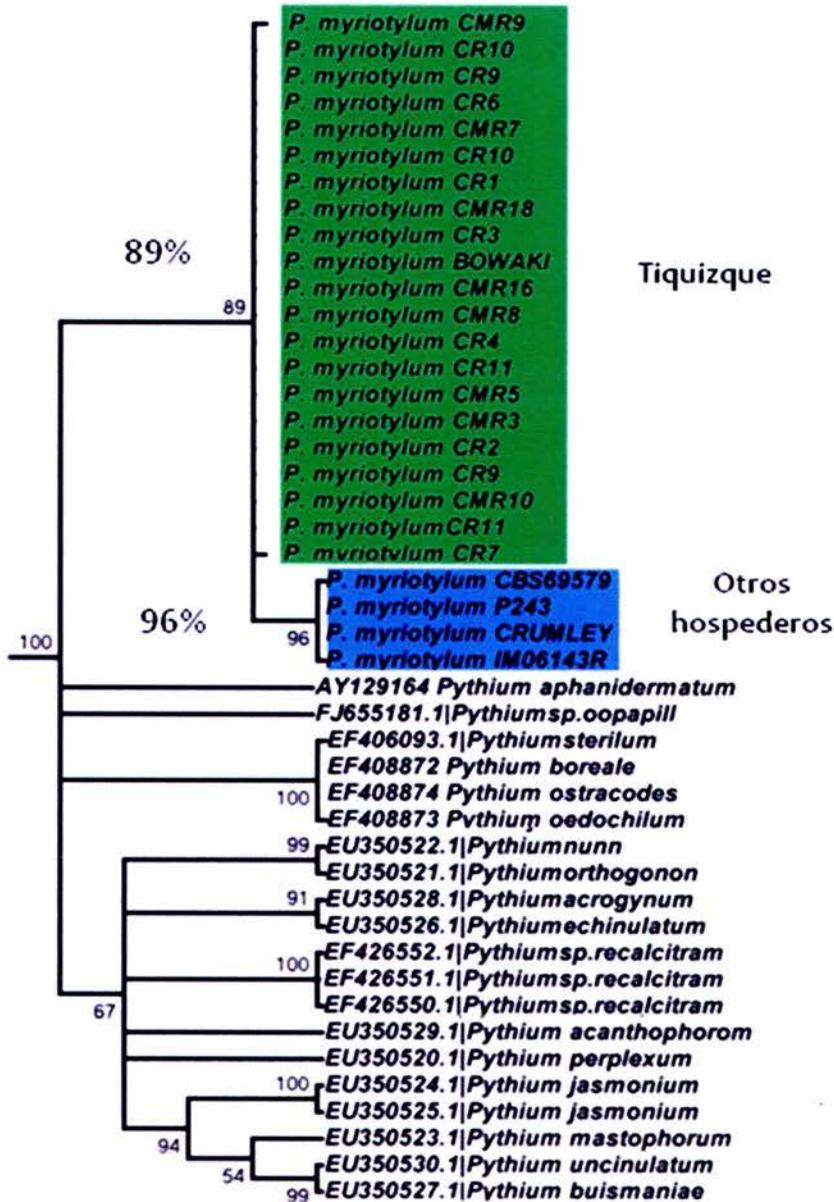


Figura 4. Árbol consenso obtenido mediante el análisis de máxima verisimilitud a partir de las secuencias del gen COXI de los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium*. En la figura se muestran los valores del “bootstrap” (>%50) obtenidos mediante una búsqueda heurística de 1000 replicaciones. TL=738; CI=0.642; RI=0.866; RC=0.556, HI=0.358.

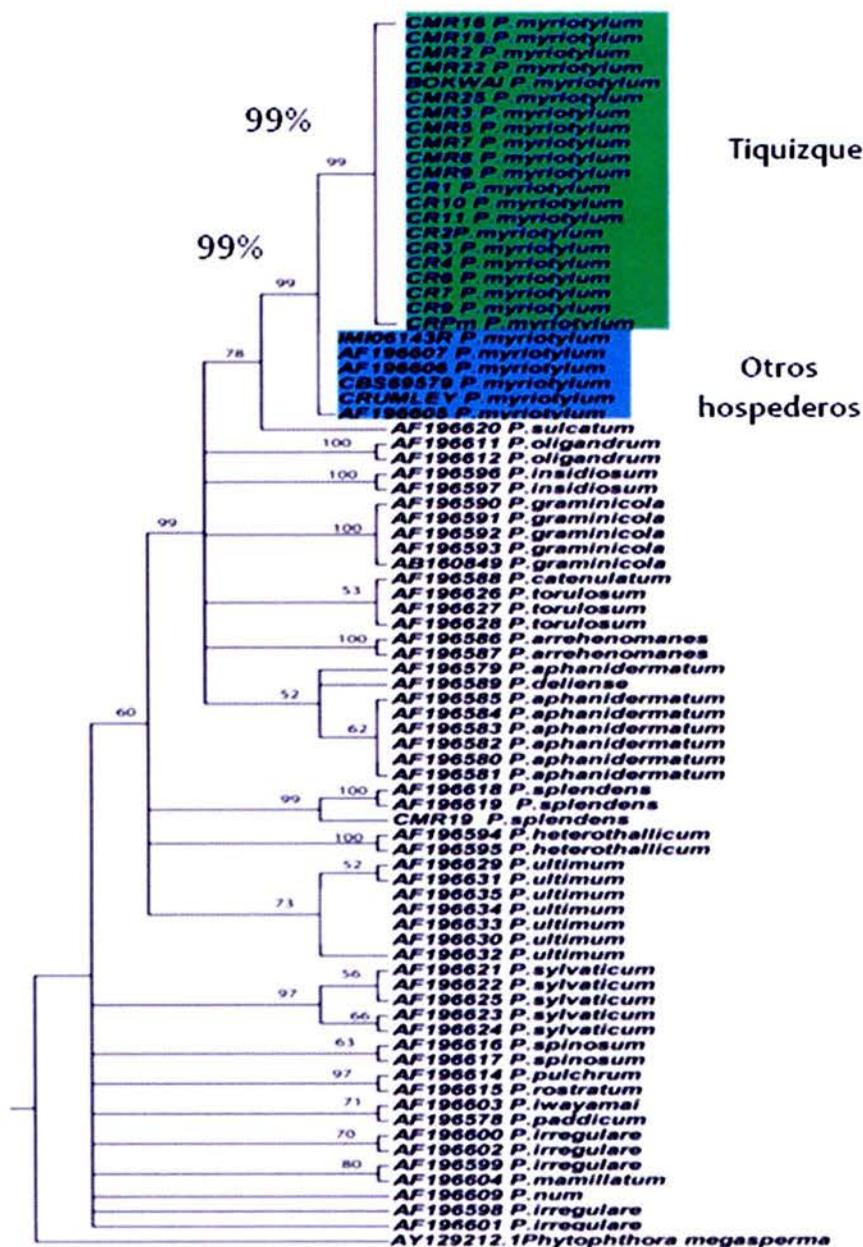


Figura 6. Árbol consenso obtenido mediante el análisis de máxima verisimilitud a partir de las secuencias del gen citocromo oxidasa dos (COXII) de los aislamientos de *P. myriotylum* de Tiquizque y otras especies de *Pythium*. En la figura se muestran los valores del “bootstrap” (>50%) obtenidos mediante una búsqueda heurística de 1000 replicaciones. TL=530; CI=0.428; Ri=0.875; RC=0.375, HI=0.572

5. DISCUSIÓN

ADN nuclear

El gen de β - tubulina, codifica para una de las familias conservadas de las tubulinas y se asocia a estructuras como los microtúbulos, los flagelos de las células eucarióticas y el huso acromático. La secuencia de este gen es utilizada para los análisis moleculares por ser una secuencia altamente conservada y común a todos los eucariotas. Otra ventaja es que las inserciones y las deleciones son poco comunes en este gen, por lo que los alineamientos son menos ambiguos. En los últimos años, el uso de este gen para establecer relaciones filogenéticas entre hongos se ha incrementado, aunque dentro de los oomicetes los reportes de la utilización de la β -tubulina para establecer relaciones filogenéticas son pocos. En el 2006, Villa *et al.* utilizaron este gen para estudiar diferencias interespecíficas e intraespecíficas entre especies de *Pythium* y *Phytophthora*; el análisis permitió la formación de 4 grupos, que coincidieron con las características de las estructuras reproductivas. En el 2008 Moralejo *et al.* clasificaron una nueva especie de *Pythium*, *P.recalcitrans*, por medio de este gen. Por otra parte en el 2004, Kroon *et al.*, con el uso de este mismo gen, lograron una clasificación más precisa de las especies dentro del género *Phytophthora*.

La β -tubulina ha sido también utilizada para establecer relaciones filogenéticas en otra gran cantidad de hongos. O'Donnell *et al.*, (1998) reportaron que hay 3,5 veces más información filogenética en los genes de la β -tubulina que en los genes del rADN y lo proponen como un marcador útil para estudiar relaciones cercanas en *Fusarium*. Barnes *et al.* (2001) utilizaron la β -tubulina para caracterizar las especies del hongo *Seiridium spp.* que afecta al ciprés y en el 2004 Schoers *et al.* identificaron una nueva especie de *Fusarium* (*F. foetens*) que afecta a las plantas de begonia. Por medio de esta técnica, en el 2008 Park *et al.* estudiaron la relación filogenética entre *Alternaria radicina* y *A. carotiincultae*, este último agente causal de la pudrición negra en zanahoria, conocida también como “carrot black rot”.

En el presente estudio, en las Figuras 1 y 2, el análisis de máxima parsimonia y máxima verisimilitud de la β -tubulina agruparon consistentemente a los aislamientos de *P.myriotylum* patogénicos a tiquizque, tanto de Costa Rica como de Camerún, en un grupo diferente al de los aislamientos no patogénicos provenientes de otros hospederos, con un valor bootstrap de 91% y 89% respectivamente.

ADN mitocondrial

El genoma mitocondrial contiene genes que varían constantemente, pero a la vez posee regiones más conservadas, lo que lo convierte en un candidato ideal para estudios de variabilidad entre especies y entre individuos de la misma especie. En adición a estas características, el ADN mitocondrial posee características que favorecen su uso para estudios taxonómicos y filogenéticos, tales como un reducido tamaño, una alta tasa evolutiva, un alto contenido de residuos adenina-timina (AT) y el hecho de ser una molécula haploide, donde la mayoría de los alelos poseen la misma función e inclusive

poseen regiones universalmente conservadas (Burns et al. 1991). Así, los genes que codifican para el metabolismo, tales como la citocromo oxidasa II (COXII) y citocromo oxidasa I (COXI), han sido usados en este tipo de estudios (Villa *et al.*, 2006).

El gen de la citocromo oxidasa II, codifica para la enzima que cataliza el paso final en la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. En el año 2000, Hudspeth *et al.* utilizaron este gen para establecer relaciones filogenéticas en los Peronosporomycetes. Ese mismo año, Martin estudió 24 especies de *Pythium* con este gen y reportó la formación de tres grupos principales, lo que coincidió con la clasificación morfológica basada en estructuras reproductivas. El COX II ha sido utilizado también para identificar nuevas especies de *Pythium*, por ejemplo, Nechwatal y Thompson, (2005), comunicaron la existencia de *P. phragmitis* que afecta las algas rojas, Garzon *et al.* (2007), comunicaron una nueva especie de *Pythium*, *P. cryptoirregulare*, muy cercana a *P. irregulare* y Morajelo *et al.* (2008), con la ayuda del COXII y otro genes, identificaron la especie *P. recalcitans*. Este gen también se ha utilizado para establecer relaciones filogenéticas en *Phytophthora* así como la identificación de nuevas especies (Martin y Tooley, 2003; Kageyama *et al.*, 2005; Man in T'veld, 2007; Gómez *et al.*, 2008). Spies *et al.*, 2011 realizaron un análisis filogenético del ITS, COX I y COX II, para estudiar la variabilidad presente en un aislamiento *Pythium vexans*.

En este estudio, el análisis con los genes mitocondriales COXI y COXII, como se observa en las Figuras 3, 4, 5 y 6, muestra una situación similar al caso de la β -tubulina: los aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos a tiquizque forman un grupo diferente de los aislamientos de *P. myriotylum* no patogénicos de otros hospederos. Esta agrupación es

apoyada por un valor de bootstrap de 100% y 97% para máxima parsimonia para los genes COXI y COXII, respectivamente, y un valor de 89% y 99% para máxima verisimilitud, valores aún mayores a los encontrados en el caso de la β -tubulina.

En resumen, los tres genes analizados (β -tubulina, COXI y COXII), muestran la misma tendencia, por lo que los aislamientos de *P. myriotylum* que infectan tiquizque se pueden diferenciar molecularmente de las cepas no patogénicas a tiquizque de *P. myriotylum* que causan pudrición de raíces en otras plantas. Los aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos a tiquizque son muy similares entre sí (Figuras 1 a 6), independientemente de su origen geográfico y diferentes a los aislamientos no patogénicos, lo cual constituye evidencia más de la posible existencia de un proceso de especialización por hospedero de estos aislamientos, en este caso hacia el cultivo del tiquizque.

Esta especialización por hospedero ha sido observada en *Ceratocystis fimbriata*. Este organismo causa marchitez en especies leñosas y podredumbre en raíces y bulbos. Se ha observado que sus poblaciones naturales tienden a tener una distribución geográfica restringida, varían en su agresividad a distintos huéspedes, y algunas poblaciones aisladas se han especializado para los huéspedes nativos (Thorpe *et al.*, 2005). Thorpe *et al.*, (2005) determinaron que los aislamientos provenientes de plantas de la familia Araceae no pueden infectar plantas dicotiledóneas y proponen la hipótesis de que esta especialización puede ser facilitada por los mecanismos de propagación.

Otro caso de especialización por hospederos es el de *Corynespora cassicola*, un patógeno que causa daño en hojas, tallos y raíces y que ha sido reportado en más de 530

especies de plantas, desde monocotiledóneas, dicotiledóneas, hasta helechos y cicas. Por ejemplo, Dixon *et al.*, (2009) estudiaron la diversidad genética de este hongo, de acuerdo al ámbito hospederos y la distribución geográfica, y encontraron que los aislamientos de papaya (*Carica papaya*) provenientes de Asia presentaban especialización por hospedero. En el 2003, Pereira *et al.* encontraron un alto grado de especialización de este mismo organismo hacia *Lantana camara*.

La especialización por hospedero también se ha presentado en *Ascochyta* spp., que afectan principalmente leguminosas (Hernández *et al.* 2006) y en *Alternaria* spp., que producen en los cítricos lo que se conoce como “Brown spot” o mancha marrón de los cítricos (Peever *et al.*, 2000)

La evidencia encontrada por otros autores (Tambong *et al.*, 1999, Perneel *et al.*, 2006, Gómez *et al.*, 2011, Muñoz *et al.*, 2011) y la evidencia encontrada en este estudio, nos ponen ante la posibilidad de que el *P. myriotylum* que ataca el tiquizque sea una especie que ha sufrido un proceso de especialización por hospedero. Como se observa en las figuras 1 a 6, los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque forman un grupo diferente de los aislamiento de *P. myriotylum* de otros hospederos, esto siempre apoyado por un alto valor de bootstrap. Las pocas diferencias en las secuencias de ITS (dos pares de bases) de los aislamientos de tiquizque y los aislamientos de otros hospederos sugieren una reciente separación, y un proceso de especiación siendo la especialización por hospedero la fuerza impulsadora.

Basado en toda esta evidencia podríamos decir que sí estamos ante una nueva especie de *Pythium*, que afecta al tiquizque; sin embargo, algunos autores consideran que es necesario más variabilidad en la región de ITS (Paulitz *et al.*, 2003; Levesque and

Cock, 2004; Nechwatal *et al.*, 2006) para definir nuevas especies, y consideran que la variación de uno o dos pares es una variación interespecífica dentro de la misma especie.

Hay otros criterios que se podrían utilizar para definir una nueva especie, uno de ellos es la concordancia genealógica. La concordancia genealógica se utiliza para definir una especie filogenética. Esta metodología se basa en comparar la genealogía de varios genes; Cuando los árboles muestran la misma topología o concordancia, se debe a la previa fijación de los loci polimórficos, la incongruencia en la topología indica flujo de genes. En 2002, Couch y Kohn, utilizan el concepto de concordancia genealógica para definir una nueva especie *Magnaporthe oryzae* asociada a *Oryza sativa*. El análisis del gen nuclear β -tubulina y los genes mitocondriales COXI, COXII muestran concordancia genealógica, los tres genes separan los aislamientos patogénicos a tiquizque de los no patogénicos, con esta evidencia y la evidencia encontrada por otros autores podríamos definir a *P.myriotylum* aislado de tiquizque como una especie nueva.

6. LITERATURA CITADA

BARNES I., ROUX J., WINGFIELD M.J. , COETZEE M.P.A., WINGFIELD B.D. 2001. Characterization of *Seiridium* spp. Associated with cypress canker based on β -tubulin and histone sequences. Plant Disease 85: 317–321.

BELL D.K., MINTON N.A., 1973. Post emergence damping-off of peanut plants caused by *Pythium myriotylum*. Phytopathology 63: 1544–1545.

BOUDJEKO T., OMOKOLO N., DRIOUICHA., BALANGÉ A.P. 2005. Peroxidase and Pectin methyl esterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. *Phytopathology* 153, 409 – 416.

BURNS T., WHITE T., TAYLOR J. 1991. Fungal molecular systematic. *Annual Review of Ecology and Systematic* 22: 525- 564.

DIXON L., SCHLUBR,S., PERNEZNY K., DATNOFF L. 2009. Host Specialization and Phylogenetic Diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 99: 1015-1027

COUCH B., KOHN L.2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae* , from *M. grisea*. *Mycologia*, 94(4) 683-693.

GARZÓN C., YANEZ J., MOORMAN G. 2007. *Pythium cryptoirregulare*, a new species within the *P. irregulare* complex. *Mycological*. 99(2):. 291–301.

GÓMEZ-ALPÍZAR L., SAALAU E., PICADO I., TAMBONG J.T., SABORÍO F. 2011. "A PCR-RFLP assay for identification and detection of *Pythium myriotylum*, causal agent of the cocoyam root rot disease. *Letters in Applied Microbiology*. 52(3), pp. 185-192.

GÓMEZ L., HUI HU C., OLIVA R., FORBES G., RISTAINO J. 2008. Phylogenetic relationships of *Phytophthora andina*, a new species from the highlands of Ecuador that is closely related to the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Mycological*, 100(4); 590-602

Hernandez-Bello MA., Chilvers MI., Akamatsu H., Peever TL. 2006. Host specificity of Ascochyta species infecting legumes of the Viciae and Cicerae tribes and the pathogenicity of an interspecific hybrid. *Phytopathology* 96:1148–1156

HUDSPETH D.S.S., NADLER S.A., HUDSPETH M.E.S. 2000. A *cox2* molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycological* 92:674–684.

KAGEYAMA K., NAKASHIMA A., KAJIHARA Y. 2005. Phylogenetic and morphological analyses of *Pythium graminicola* and related species. *Journal of Genetic Plant Pathology*. 71:174-182.

KROON L., BAKKER F., VANDEN BOSCH G., BONANTS P., FLIER, W. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*. 41(8):766:778

LEVESQUE A., DE COCK M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *pythium*. *Mycological Research* 108: 1363-1383.

MCCARTER S.M., LITTRELL R.H. 1968. Pathogenicity of *Pythium myriotylum* to several grass and vegetable crops. *Plant Disease Reporter* 52: 179–183

MAN IN 'T VELD W. 2007. Gene flow analysis demonstrates that *Phytophthora fragariae* var. *rubi* constitutes a distinct species, *Phytophthora rubi* comb. nov. *Mycological*, 99(2), pp. 222–226.

MARTIN F. 2000. Phylogenetic relationships among *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrial encoded cytochrome oxidase II gene. *Mycological research* 92 (4): 711-727.

MARTIN F.N., TOOLEY P.W. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of the mitochondrial encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycological* 95(2): 269–284

MORALEJO E., CLEMENTE A., DESCALS E. *Pythium recalcitrans* sp. nov. revealed by multigene phylogenetic analysis. *Mycological*, 100(2), pp. 310–319.

MURRAY M., THOMPSON W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8 (19):4321-4325.

NECHWATAL J., MENDGEN K. 2006. *Pythium litorale* sp. nov., a new species from the littoral of Lake Constance, Germany. *FEMS Microbiol Lett* 255:96–101

MUÑOZ, G. 2011. Evaluación de la patogenicidad de diversos aislamientos de *Pythium myriotylum*. Tesis presentada para optar por el grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 50p.

O'DONNELL K., CIGELNIK E., NIRENBERG H.I.1998.: Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycological*, 90 (3):465-493.

PACUMBABA R.P., WUTOH J.G., EYANGO S.A., TAMBONG J.T., 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.

PAULITZ T., ADAMS K., MAZZOLA M. 2003. *Pythium abapressorium* a new species from eastern Washington. *Mycological*. 95(1); 80–86.

PEREIRA J. , BARRETO R., ELLISON C., MAFFIA L. 2003. *Corynespora cassiicola* f. sp. *lantanae*: a potential biocontrol agent from Brazil for *Lantana camara*. *Biological Control*.26(1):21-31

PERNEEL M., TAMBONG J.T. , ADIOBO A., FLOREN C., SABORÍO F., LÉVESQUE A., HÖFTE M. 2006. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. *Mycological* 110 (5): 583-593.

PEEVER T.L., OLSEN L., IBAÑEZ A., TIMMER L.W. 2000. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine × grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathology* 90:407-414.

POREBSKY S., BAILEY L.G., BAUM B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular. Biology. Rep.* 15: 8-15.

REELEDER R.D., HAGEDORN D.J. , 1981. Inheritance of resistance to *Pythium myriotylum* hypocotyls rots in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Disease* 65: 427–429

SABORÍO F. 2004. Breeding of neglected and under-utilized crops, spices and herbs, Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schoot). Science Publishers. Cap. 11.170-187p.

SCHROERS H., BAAYEN R., MEFFERT F., GRUYTER J., HOOFTMAN M., O'DONNELL.2004. *Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elation

hybrids (*Begonia x hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex. *Mycological*, 96(2); 393-406.

SPIES C., MAZZOLA M., WILHELM J., VAN DER RIJST M., MOSTERT L., MCLEOD A. 2011. Oogonial Biometry and phylogenetic Analysis of the *Pythium Vexans* Species Group from Woody Agricultural Hosts in South Africa Reveal Distinct Groups within this Taxon. *Fungal Biology*. 115:157-168.

SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods) version 4. 0. Sunderland, Massachusetts: Sinauer associates.

PARKS M., ROMANOSKI C., PRYOR B. A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotiincultae*. 2008. *Mycological*. 100(3), pp. 511-527

TAMBONG J.T., POPPE J., HÖFTE M. 1999. Pathogenicity, electrophoretic characterisation and *in planta* detection of the cocoyam root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. *European Journal of Plant Pathology* 105: 597-607.

TAMBONG J.T., HÖFTE M. 2001. Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA 1. *European Journal of Plant Pathology* 107: 511 – 521.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. 1997. Clustal-X, software for Power PC. Heidelberg European Molecular Biology Organization.

THORPE D.J., HARRINGTON T.C., UCHIDA J.Y, 2005. Pathogenicity, internal transcribed spacer-rDNA variation, and human dispersal of *Ceratocystis fimbriata* on the family Araceae. *Phytopathology* 95:316–323

VILLA N., KAGEYAMA K., SUGA H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS, rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycological* 98 (3): 410-422.

WANG P.H., CHUNG C., LIN Y., YEH Y. 2003. Use of polymerase chain reaction to detect the soft rot pathogen, *Pythium myriotylum*, in infected ginger rhizomes. *Letters in Applied Microbiology* 36: 116 – 120.

WATERHOUSE G.M., WATERSTON J.M. 1966. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 118. Commonwealth Mycological Institute, Kew

CAPITULO III

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *PYTHIUM MYRIOTYLUM* AGENTE CAUSAL DEL MAL SECO EN TIQUIZQUE (*XANTHOSOMA* SP.) EN COSTA RICA MEDIANTE LA TÉCNICA PCR-RFLP

1. RESUMEN

El tiquizque (*Xanthosoma sp.*) es una planta herbácea que produce cormelos comestibles. Estos son parte de la dieta básica de millones de personas alrededor del mundo. El área cultivada de tiquizque en Costa Rica y en países como Nicaragua, Puerto Rico y Camerún, ha disminuido considerablemente por la enfermedad conocida como Mal Seco que es causada por *Pythium myriotylum*. Estudios bioquímicos y moleculares han revelado evidencias de especialización (especiación) del *P. myriotylum* asociado a tiquizque. En el presente estudio se amplificó una región del gen de la citocromo oxidasa subunidad II (COXII) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de ADN de aislamientos de *P. myriotylum* proveniente de tiquizque y de otros hospederos, así como de otras especies de *Pythium*. El producto de PCR fue digerido independientemente con enzimas de restricción (RFLP). Con la enzima, RSA I, el patrón de restricción de los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque difirió del correspondiente a los aislamientos del patógeno provenientes de otros hospederos y de otras especies de *Pythium*. Este resultado genera un método seguro, rápido y preciso para la identificación del aislamiento de tiquizque de otros aislamientos de *P. myriotylum* y contribuye a confirmar la hipótesis de especialización de *P. myriotylum* en tiquizque.

2. INTRODUCCIÓN

El tiquizque (*Xanthosoma sp.*) pertenece a la familia de las Araceae y es originario de la parte norte de América del Sur; aunque su distribución abarca desde Perú hasta México (León 1987, O'Hair y Asokan 1986). Posee un rizoma cormoso principal, subterráneo, a partir del cual se generan rizomas secundarios o cormelos. Estos cormelos son comestibles y son parte de la dieta básica de aproximadamente 200 millones de personas en países de toda la franja tropical en Asia, África y América (Onokpise *et al.* 1999).

El principal problema que limita el crecimiento del cultivo es la enfermedad conocida como Mal Seco (Root Rot Disease), que causan hasta un 100 % de pérdidas en producción, según el momento de aparición durante el ciclo del cultivo (Laguna *et al.*, 1983; Morales, 2007). Entre los síntomas que produce la enfermedad está: la clorosis de las hojas viejas; además el peciolo o soporte de las hojas se dobla y forma una especie de arco, solo una o dos de las hojas jóvenes se conservan verdes y las raíces se pudren. La enfermedad se presenta principalmente durante la estación lluviosa. El agente causal ha sido identificado como *Pythium myriotylum* (Nzietchueng, 1984; Pacumbaba *et al.*, 1992; Tambong *et al.*, 1999). En Costa Rica se ha asociado el Mal Seco a un complejo de microorganismos; sin embargo, en estudios realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica

(LBP), se comparó la patogenicidad de diferentes hongos (*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *P. myriotylum*) aislados a partir de las raíces de plantas enfermas de tiquizque, y se encontró que solo *P. myriotylum* es capaz de cumplir con los postulados de Koch (Ureña et al., en preparación).

El género *Pythium* es complejo e incluye más de 100 especies, de las cuáles algunas son saprófitas facultativas y otras atacan a plantas, animales, peces y humanos. Son organismos habitantes del suelo, con distribución mundial, aunque con predominio en los suelos del Trópico y Subtrópico. Produce daños en cultivos, tanto en semillero como en cultivos bajo invernadero y en el campo. Este patógeno causa daños en raíces y semillas en una gran variedad de cultivos que incluyen tiquizque, yuca, ñampí, camote, papa, malanga, frijol, tomate, chile, zanahoria, vainica, chayote, espinaca, arveja, ayote, melón, tabaco, maíz, arroz, trigo, papa, caña de azúcar, sandía, papaya, piña, fresa, pepino, coníferas, pastos y una gran cantidad de plantas ornamentales como gerbera, euforbias, pelargonium, cordiline, crisantemos, caladium, tulipanes, vinca, clavel, dragones, begonias, girasol, jengibre, etc. (Lévesque *et al.*, 2004, Van der Plaats-Niterink, 1981). Las especies de *Pythium* rara vez exhiben especificidad por hospederos (Moorman *et al.* 2002); sin embargo, estudios realizados en Bélgica por Tambong *et al.* (1999), y más recientemente por Perneel *et al.* (2006), han mostrado que los aislamientos de *P. myriotylum* de tiquizque, muestran diferencias fisiológicas, bioquímicas y moleculares a los aislamientos de *P. myriotylum* de otras plantas (sorgo, piña, tabaco, *Gypsophila sp.*, frijol), por lo que se ha llegado a considerar que los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque muestran cierto grado de especialización. Asimismo, en el LBP (Laboratorio de

Biotecnología de Plantas), se ha observado que el *P. myriotylum* aislado de tiquizque posee un ámbito de hospederos muy reducido (Muñoz *et al.*, en preparación).

La identificación tradicional de las especies de *Pythium*, y otros microorganismos en general, se basa en características morfológicas; sin embargo, este método presenta la dificultad de que en *Pythium* estas características pueden variar de acuerdo al medio de cultivo y a las condiciones en que se desarrolle y, en algunos casos, estas características pueden aparecer y desaparecer en el proceso evolutivo, lo que hace su identificación confusa y difícil, lo que a su vez dificulta los estudios patológicos de este organismo (Lévesque *et al.*, 2004; Kageyama *et al.*, 2005).

Alternativamente a la clasificación basada en caracteres morfológicos, esta se puede hacer basada en caracteres moleculares. Lo anterior es cada vez más utilizado para la detección e identificación de patógenos en plantas, especialmente a nivel de especie, ya que son más rápidas, fáciles y precisas que las técnicas morfológicas, y no requieren de personal con experiencia en cada uno de los géneros. En *Pythium* se han utilizado diferentes técnicas tales como: la identificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con imprimadores específicos (Cheng *et al.*, 1992; Kageyama *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2003); la identificación a nivel de especie mediante la técnica PCR-RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) (Wang and White, 1997; Godfrey *et al.*, 2003; Kageyama *et al.*, 2005); el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Garzón *et al.* 2007); y las isoenzimas (Cheng y Schneider, 1991; Barr *et al.*, 1997). Otra técnica es la de macroarreglos: Tambong *et al.* (2006), diseñaron un arreglo de ADN con el propósito de detectar y diferenciar rápidamente más de 100 especies de *Pythium*.

La técnica PCR-RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), se ha convertido en una herramienta útil para la identificación de especies de *Pythium* estrechamente relacionadas. Cheng y Hoy (1993) utilizaron la técnica (ITS-RFLP) para poder diferenciar aislamientos de *Pythium arrhenomanes* de aislamientos de *P. graminicola*; por otra parte Matsumoto *et al.*, 2000, utilizaron la técnica para diferenciar aislamiento de *P. irregulare* de diferentes hospederos y de *P. sylvaticum*.

El objetivo de la presente investigación fue analizar la región COX II, para determinar si existen sitios de restricción entre las especies de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque, las especies de *P. myriotylum* de otros hospederos y otras especies de *Pythium*, que permitan establecer un método de diagnóstico, rápido y preciso.

3. MATERIALES Y METODOS.

Las secuencias del gen mitocondrial COX II de *P. myriotylum* proveniente de tiquizque, así como las secuencias de otros *P. myriotylum* y otras especies de *Pythium* obtenidas de GenBank –NCBI (Cuadro1), fueron importadas y alineadas con BioEdit software (Hall 1999), luego del alineamiento se realizó un análisis de sitios de restricción con el mismo programa. Con el análisis de los mapas de restricción se seleccionó la enzima *Rsa I* (GT⁺AC) (Fermentas UAB, Life Sciences, Lithuania), que muestra un sitio único de corta, que permite diferenciar a los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de tiquizque de los aislamientos provenientes de otros hospederos y otras especies de *Pythium*.

Cuadro 1. Aislamientos de *Pythium* utilizados en este estudio.

Aislamiento	Hospedero	Origen	Especie	Fuente
CMR10	Tiquizque	Camerún	<i>P.myriotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> 2006
CMR5	Tiquizque	Camerún	<i>P.myriotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> 2006
CMR3	Tiquizque	Camerún	<i>P.myriotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> 2006
CR2	Tiquizque	Costa Rica	<i>P.myriotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> 2006
CR10	Tiquizque	Costa Rica	<i>P.myriotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> 2006
CR11	Tiquizque	Costa Rica	<i>P.myriotylum</i>	Perneel <i>et al.</i> 2006
P249	Gypsophila	Israel	<i>P.myriotylum</i>	The Volcani Centre, Israel
IMI06143R	Piña	Australia	<i>P.myriotylum</i>	IMI
Tobacco	Tabaco	Estados Unidos	<i>P.myriotylum</i>	Universidad de Tennessee
Myt 14	Suelo	Camerún	<i>P.inflatum</i>	Tambong <i>et al.</i> 1999
Fu-1	Tiquizque	Costa Rica	<i>Fusarium sp.</i>	Este estudio
Rhizo-1	Tiquizque	Costa Rica	<i>Rhizoctonia sp.</i>	Este estudio

Los aislamientos de *P. myriotylum* utilizados habían sido obtenidos de raíces infectadas de tiquizque, tanto de plantas provenientes de Costa Rica como de Camerún.

Los aislamientos se conservan en el LBP en medio PARC (Corn meal agar + Pimaricina +Riframpicina + Ampicilina).

Para la obtención de micelio de *Pythium*, se colocaron tres cuadros (1mm x 1mm) de agar con crecimiento de hongo, en un tubo de micro centrífuga de 1,7 ml con medio V8 líquido al 20 % (100 ml de jugo V8, 1 g de CaCO₃, 400 ml de agua destilada), durante seis días a 28 °C en oscuridad y con agitación constante.

Para la obtención de micelio de *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. se colocaron tres cuadros (1mm x 1mm) de agar con crecimiento de hongo, en un tubo de micro centrífuga de 1,7 ml con medio PDB (Potato Dextrosa Broth), con las mismas condiciones de oscuridad y temperatura de *Pythium*.

3.1. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN se extrajo a partir del micelio obtenido en la etapa anterior, por el método CTAB modificado de Murray y Thompson (1980) y Porebsky *et al.* (1997). Primero se centrifugó el micelio para eliminar el medio de cultivo, luego se le agregó 150 µl de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8), 1.4 M NaCl) y el tejido se maceró con un taladro hasta obtener una fase homogénea. Se agregó 150 µl de buffer CTAB (2% CTAB (w/v)), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8), 1.4 M NaCl), posteriormente se incubó a 67 °C por 1 h. Después de la incubación, se agregó un volumen de 300 µl de fenol: cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por

inversión. La mezcla fue centrifugada a 12000 rpm por 15 min, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, luego se repitió la centrifugación una vez más. Se agregó 20 µl de acetato de sodio y 300 µl de isopropanol frío y se incubó durante 12 h a -20⁰C. Al concluir el período de incubación se centrifugó a 13000 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante, se realizaron 2 lavados con 150 µl de etanol al 70 %. El precipitado se secó en una cámara de flujo laminar y fue resuspendido en 50 µl de agua nano pura estéril. El ADN obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro BECKMAN DU 530, y posteriormente se almacenó a -20⁰C.

Para la obtención de ADN de raíces, se tomó 1 g de raíces de plantas provenientes del campo con síntomas típicos de la enfermedad, y que presentaban un alto grado de deterioro y se extrajo el ADN, con el método descrito anteriormente.

3.3. REACCIÓN DE CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La región mitocondrial COXII fue amplificada con los imprimadores FM58 (5' CCACAAATTTCACTACATTGA3') FM66 (5'TAGGATTTCAAGATCCTGC3'), que fueron obtenidos del gen COXII de *Phytophthora megasperma* y descritos por Martín (2000). La reacción de amplificación consistió en 1 µl de 10x Buffer (*Taq* Titanium Buffer, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, Canadá), 0,50 µl de dNTP, 0,04 µl de cada imprimador, 0,10 µl *Taq* ADN polimerasa (Titanium/ultra therm, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, Canadá), 7,32 µl agua nano pura y 1 µl de ADN. Los ciclos térmicos utilizados para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94⁰C por 3min; seguido por 40 ciclos a 94⁰C por 1 min, 52⁰C por 1 min, 72⁰C por 2 min; y un último ciclo de elongación a 72⁰C por 10 minutos. los

cuales se llevaron a cabo en un termociclador Perkin-Elmer Cyclor (GeneAmp® PCR System 9700). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis, en geles de agarosa (UAB, Life Sciences, Lithuania) al 1,6 % (w/v) con buffer 0,5 x tris-buffer (TBE), 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. La visualización de los fragmentos se realizó con luz ultravioleta (uv). El tamaño de los fragmentos se determinó con el marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Fermentas UAB, Life Sciences, Lithuania).

3.2. POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Los productos de PCR fueron digeridos con la endonucleasa *Rsa I* (Fermentas UAB, Life Sciences, Lithuania). El volumen total de reacción fue de 10 µl, compuesto de 8 µl de producto de PCR, 0,5 µl de la enzima de restricción (2-6 unidades), 0,5 µl de 10 x buffer de restricción y 1µl de agua destila estéril. La mezcla se incubó durante 24 horas a 37 °C. Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis, en un gel de agarosa (UAB, Life Sciences, Lithuania) al 2.8 %(w/v) con buffer 0.5 x tris-buffer (TBE), 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La visualización de los fragmentos se realizó con luz ultravioleta (uv).

4. RESULTADOS

Al amplificar ADN de *P.myriotylum* aislado a partir de plantas de tiquizque (provenientes de Camerún o de Costa Rica), de piña, de *Gypsophila sp.* y de tabaco y ADN de *P. inflatum*, con los iniciadores FM58 y FM66, diseñados para la amplificación de un

segmento del gen mitocondrial COXII, se observó la formación de un fragmento de ADN de aproximadamente 600 pb en todos los aislamientos (Figura 1 y 3). Al correr estos fragmentos en un gel de agarosa (1.6%), no fue posible distinguir diferencias entre ellos.

El alineamiento múltiple de estos productos de amplificación (Cuadro 2) muestra que si existen diferencias entre algunos de estos aislamientos; se muestran 7 sustituciones transicionales (G-A; T-C) entre los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque, los aislamientos de *P.myriotylum* de otros hospederos (piña, tabaco y *Gypsophila sp.*) y las secuencias de otras especies de *Pythium*. Estos polimorfismos, de nucleótido simple, se ubican en las bases, 51 pb, 81 pb, 118 pb, 132 pb, 169 bp, 412 pb, 475 pb.

Los polimorfismos encontrados en el fragmento de ADN mostrado en el cuadro 2 no permiten distinguir entre los aislamientos de *P. myriotylum* obtenidos de plantas cultivadas en Camerún y de plantas cultivadas en Costa Rica, pero sí permite distinguir entre los aislamientos provenientes de tiquizque y los aislamientos de esta misma especie en otros hospederos (piña, tabaco y *Gypsophila sp.*). También permite distinguir entre *P. myriotylum* de tiquizque y otras especies de *Pythium* (*P. aphanidermatum*, *P. graminicola* y *P. ultimum*). Sin embargo, los polimorfismo encontrados no permiten distinguir entre los aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de piña, tabaco y *Gypsophila sp.*. En el caso de *P. aphanidermatum* y *P. graminicola* no se observaron diferencias entre ellos. *P. ultimum* mostró diferencias con las otras especies de *Pythium*.

Al realizar la reacción de digestión de los productos de amplificación con la enzima RsaI (Figuras 2 y 4), se generan tres patrones de restricción diferentes, uno asociado a los aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque, tanto de Costa Rica como de Camerún, y otro

asociado a los aislamientos de *P.myriotylum* provenientes de otros hospederos y uno adicional asociado a *P.inflatum*.

La detección de la presencia de *P. myriotylum* en raíces de tiquizque a través de esta técnica de PCR-RFLP también fue posible. En la figura 1 se muestra la amplificación de una banda de ADN del mismo tamaño que la banda obtenida a partir del cultivo puro del hongo y en la figura 2 se observa que en las plantas con síntomas de Mal Seco se obtiene el mismo patrón de digestión.

Esta técnica también se evaluó en cultivos de los hongos *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*. En ninguno de estos casos se dio la amplificación con los iniciadores FM58 y FM66.

Cuadro2. Comparación de las secuencias del COXII, entre los aislamientos de *P.myriotylum* patogénicos a Tiquizque, los aislamientos de *P.myriotylum* de otros hospederos y otras especies de *Pythium*. Alineamiento múltiple con Bioedit (Hall 1999)

	460	470	480	490	500
<i>P.myriotylum</i> CMR10- Tiquizque	TTACATTCATGGGCTGTA		CTTCTTTAGGTGTAAAATTAGATGC		
<i>P.myriotylum</i> CMR5 - Tiquizque
<i>P.myriotylum</i> CMR3 - Tiquizque
<i>P.myriotylum</i> CR2 - Tiquizque
<i>P.myriotylum</i> CR10 - Tiquizque
<i>P.myriotylum</i> CR11 - Tiquizque
<i>P.myriotylum</i> P249-Gypsophila	A
<i>P.myriotylum</i> IMI06143R-Piña	A
<i>P.myriotylum</i> TBC -Tabacco	A
<i>P.graminicola</i> - AF196590	C..T	A.T	T
<i>P.aphanidermatum</i> - AF196581	C..T	A.T	T
<i>P.ultimum</i> - AF196635	GA	A.....T

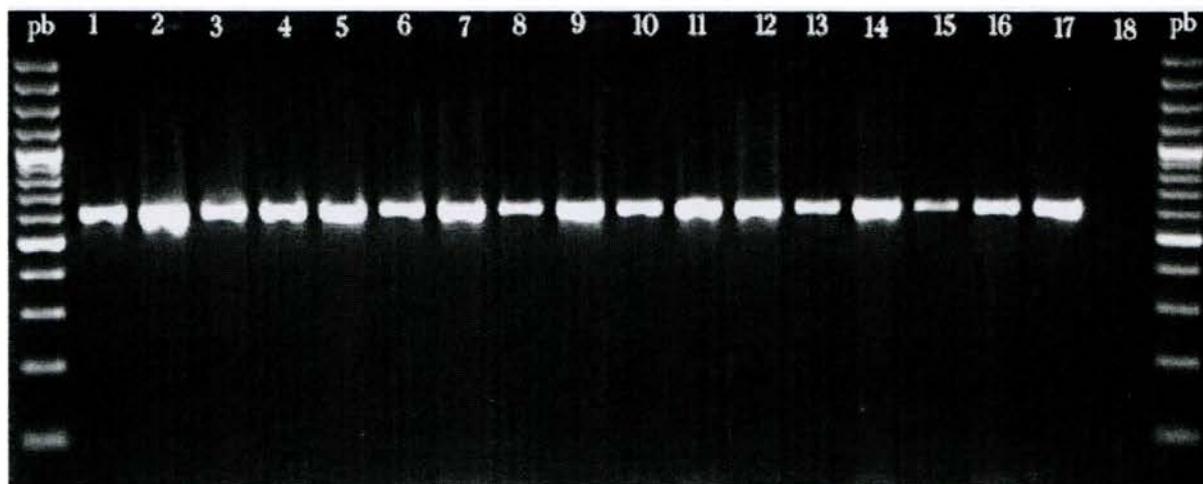


Figura 1. Gel de agarosa al 1.6% donde se observa el fragmento de ADN amplificado con los imprimadores FM66 y FM58 de la región mitocondrial COXII, carriles 1, 2, 3,4, 9, 10,11,12,y13: aislamientos de *P.myriotylum* de Tiquizque (CMR10,CMR10,CMR5,CMR5,CMR3,CR2,CR2,CR10,C11); carriles 5, 6, 7, 8: raíces infectadas con *P.myriotylum* de plantas provenientes de campo, carril 14 *P.myriotylum* (Tabaco); carril 15 *P.myriotylum* (Piña); carril 16 *P.myriotylum* (Gypsophila); carril 17 *P. inflatum* (Suelo), carril 18, control negativo.

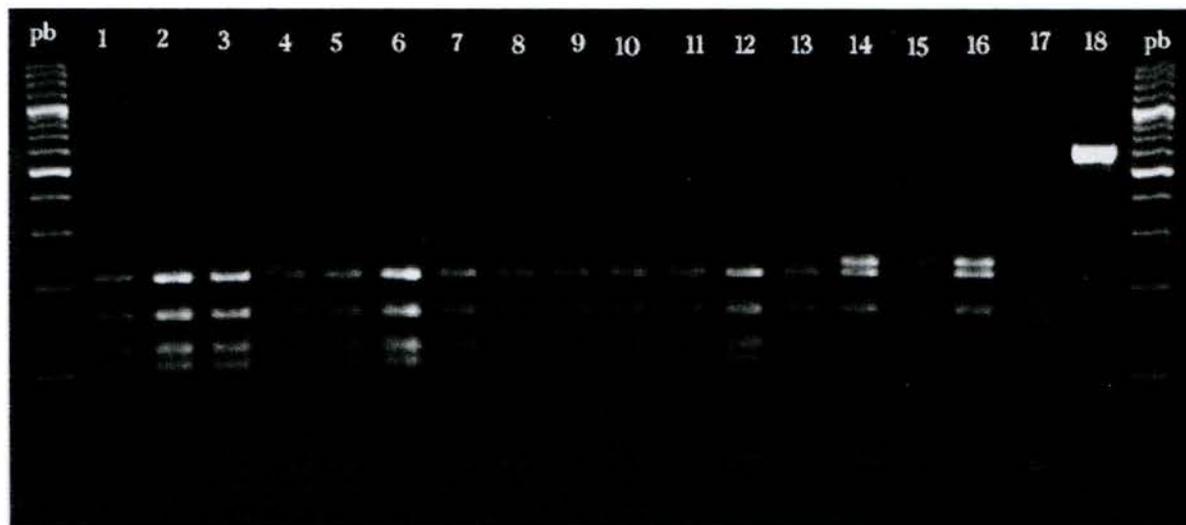


Figura 2. Digestión enzimática del producto de amplificación de la región COXII con la enzima RsaI. Carriles 1, 2, 3,4, 9, 10, 11,12, y 13 (CMR10,CMR10,CMR5,CMR5,CMR3,CR2,CR2,CR10,C11) : aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque; carriles 5, 6, 7,8: raíces infectadas con *P.myriotylum* de plantas provenientes de campo, carril 14 *P.myriotylum* (Tabaco); carril 15

P.myriotylum (Piña); carril 16 *P.myriotylum* (*Gypsophila* sp.); carril 17 *P. inflatum* (Suelo), carril 18, producto de amplificación sin digerir (600 pb).

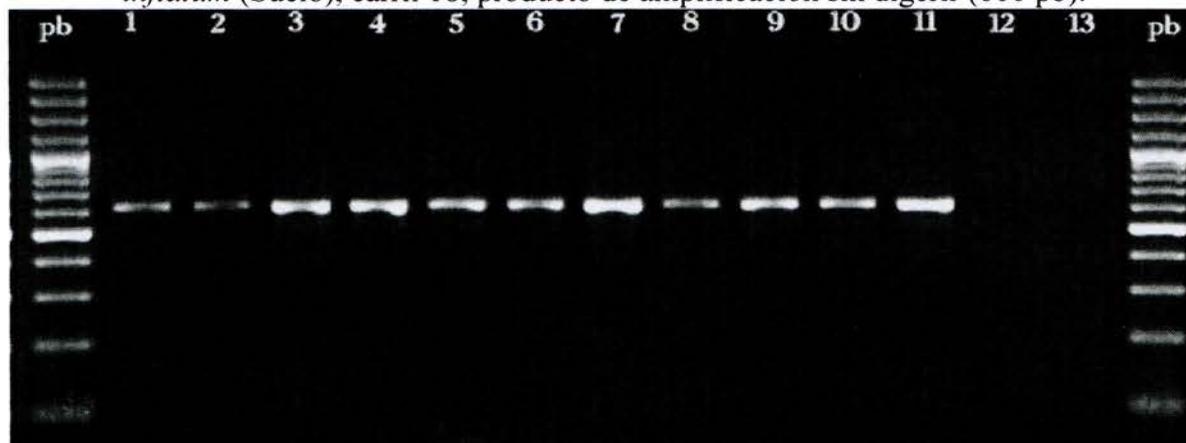


Figura 3. Gel de agarosa al 1.6% mostrando el fragmento de ADN amplificado con los imprimadores FM66 y FM58 de la región mitocondrial COXII, carriles 1, 2, 3, 4, 7 (CMR10, CMR5, CR2, CR10, C11): aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque; carriles 5 y 6: raíces infectadas con *P.myriotylum* de plantas provenientes de campo, carriles 8, 9 y 10 *P.myriotylum* (Tabaco); carril 11 *P.myriotylum* (*Gypsophila* sp.); y carril 13 control negativo.

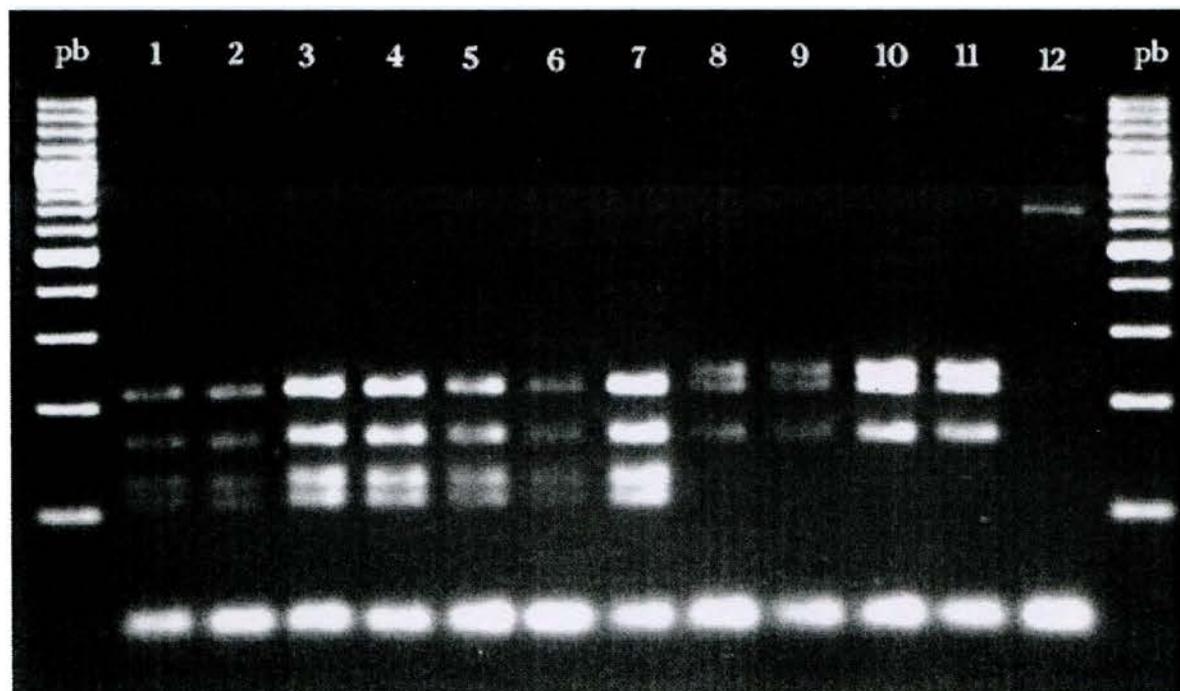


Figura 4. Digestión enzimática del producto de amplificación de la región COXII con la enzima RsaI. Carriles 1, 2, 3, 4 y 7 (CMR10, CMR5, CR2, CR10, C11)

aislamientos de *P.myriotylum* de tiquizque; carriles 5 y 6 raíces infectadas con *P.myriotylum* de plantas provenientes de campo, carriles 8 y 9 *P.myriotylum* (Tabaco); carriles 10 y 11 *P.myriotylum* (*Gypsophila* sp.); carril 12 producto de amplificación sin digerir (600 pb).

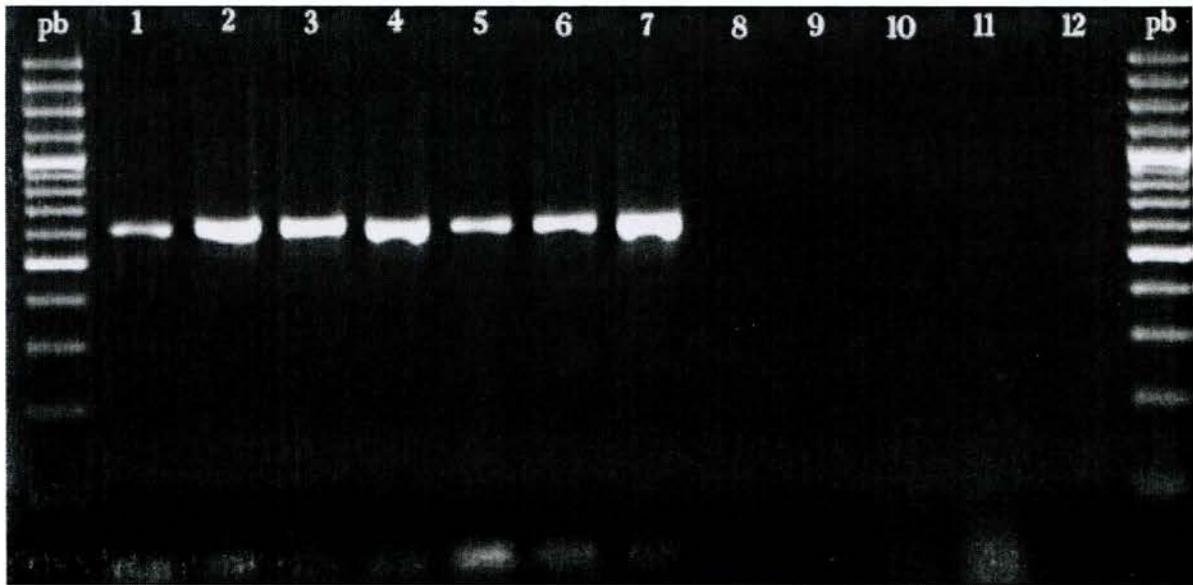


Figura 5. Gel de agarosa al 1.6% donde se observa el fragmento de ADN amplificado con los imprimadores FM66 y FM58 de la región mitocondrial COXII. Calles 1, 2, 3, 4 y 5 (CMR10, CMR5, CR2, CR10, C11); aislamientos de *P.myriotylum* de Tiquizque; carril 6 *P.myriotylum* (Tabaco); carril 7 *P.myriotylum* (*Gypsophila* sp.); calle 8 y 9 *Fusarium* sp.; Carril 10 y 11 *Rhizoctonia* sp., carril 12 control negativo.

5. DISCUSIÓN

La identificación de especies de *Pythium* basada en características morfológicas resulta difícil y confusa porque estas características pueden variar de acuerdo al medio de cultivo, a las condiciones en que se desarrolle el cultivo y, en algunos casos, estas características pueden aparecer y desaparecer en el proceso evolutivo (Lévesque *et al.*,

2004; Kageyama *et al.*, 2005). Por su parte la caracterización molecular permite una identificación rápida y precisa.

Una alternativa para la identificación molecular es la basada en el uso de secuencias de genes mitocondriales. El genoma mitocondrial involucra genes cuya secuencia es poco conservada entre diferentes organismos y a su vez posee regiones más conservadas, que lo convierte en un candidato ideal para estudios de variabilidad entre especies e individuos dentro de la misma especie. En el 2007 Eberle *et al.* por medio de un PCR-RFLP con el COXII, lograron identificar las especies de *Pythium* presentes en plántulas de arroz, con el uso de las enzimas *AhaI*, *NlaIII*. Por otra parte Kageyama *et al.*, (2007) lograron diferenciar *P.graminicola* de *P. arrhenomanes*, *P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. torulosum*, y *P. vanterpoolii*, con PCR-RFLP con el COX II y la enzimas *MboI*, *TaqI*, *EcoRI*, *AfaI* y *AluI*.

En el presente estudio los iniciadores FM58 y FM66, que fueron diseñados para la amplificación de un segmento del gen COX II en el género *Pythium*, Martín (2000), al ser utilizados en distintos aislamientos de *P. myriotylum* y *P. inflatum* produjeron la amplificación de un fragmento de ADN de tamaño muy similar de aproximadamente 600 pb en todos los casos, evidencia de un cierto grado de conservación del gen COX II en este género. A pesar de esta similitud en tamaño, al comparar las secuencias de los distintos aislamientos y de otras especies del mismo género, se encontró que existen polimorfismos a lo largo de estas secuencias. Se identificaron siete polimorfismos de nucleótido simple que corresponden a transiciones: en las posiciones 51pb, 81bp, 132bp, donde se da una

sustitución de una C por una T; y en las posiciones 169bp, 412bp, 475bp se da una sustitución de una G por una A.

En conjunto los polimorfismos identificados en estas secuencias permiten diferenciar entre las especies *P. myriotylum*, *P. graminicola* y *P. ultimum*, aunque no logra diferenciar entre *P. graminicola* y *P. aphanidermatum*. Además logran hacer una clara diferenciación entre los aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos a tiquizque de los aislamientos de esta misma especie no patogénicos a tiquizque.

El polimorfismo ubicado en la posición 475bp tiene la particularidad de estar presente únicamente en los aislamientos de *P. myriotylum* patogénicos a tiquizque y en adición coincide con un sitio de restricción de la enzima RsaI, que corta en la secuencia en GT^rAC. Cuando los fragmentos de amplificación de los diferentes aislamientos fueron digeridos con esta enzima se encontró que se producían de 3 a 4 bandas de diferentes tamaños de acuerdo al aislamiento, lo que indicó que esta enzima cortó en al menos dos o tres sitios estas secuencias. A pesar de ser un número alto de cortes para un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases, es posible distinguir con claridad entre el patrón correspondiente a los aislamientos patogénicos de *P. myriotylum* y el de los aislamientos no patogénicos. Los aislamientos *P. myriotylum* de *Gypsophila sp.* y de tabaco muestran el mismo patrón de bandas, lo que representa el comportamiento esperado dentro de los aislamientos de *P. myriotylum*.

Esta técnica también fue evaluada en aislamientos de los hongos *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* los cuales son comúnmente encontrados en la rizosfera de tiquizque

(Perneel et al., 2006; Boudjeko, et al., 2006). Estos aislamientos no producen un fragmento de amplificación (Figura 5) debido a que los imprimadores utilizados (FM58 y FM66), fueron diseñados para amplificar un segmento mitocondrial (COX II) específico de los omicetes. Este resultado es importante porque demuestra la especificidad de la técnica, lo que es de vital importancia si se pretende utilizar a partir de ADN extraído de raíces enfermas.

La técnica PCR-RFLP propuesta constituye una alternativa para diferenciar los aislamientos de *P.myriotylum* patogénicos a tiquizque tanto de Costa Rica como de Camerún, de las especies de *P.myriotylum* no patogénicas a tiquizque y otras especies de *Pythium*. Por otra parte esta técnica también permite la identificación de la enfermedad en muestras de raíces de plantas infectadas por *P.myriotylum* (Figura 2, calles 5, 6, 7, 8), lo que permite la identificación de la enfermedad sin la necesidad de hacer los aislamientos.

Las diferencias encontradas en este estudio entre los aislamientos patogénicos y no patogénicos de *P. myriotylum* para tiquizque se suman a los estudios que indican que los primeros presentan características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares diferentes a los aislamientos de *P. myriotylum* de otros hospederos como *Ananas comosus*, *Cucumis sativus*, *Lycopersicum esculentum*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Robinia pseudoacacia*, *Solanum melongen* y *Zingiber officinale* (Wang et.al 2003; Tambong y Höfte 2001, Perneel *et al.* 2006) por lo cual proponen que este organismo, aunque claramente pertenece al género *Pythium*, muestra un grado de especialización significativo hacia el cultivo del tiquizque.

La técnica desarrollada genera un método seguro, rápido y preciso para la identificación de los aislamientos patogénicos a tiquizque, tanto en muestras de plantas como suelo, lo que constituye un beneficio para los productores que desean identificar las causas de los síntomas de una manera certera. La efectividad de la técnica se puede ver afectada porque el micelio de *Pythium* puede ser homotálico, lo cual significa que la reproducción puede ocurrir sin la intervención de 2 talos diferentes o heterotalico lo que significa que 2 ó más micelios haploides, se juntan y debe ocurrir diploidización, lo que afecta la técnica porque los caracteres mitocondriales se heredan por vía materna y no se puede definir quién va a actuar como madre.

6. LITERATURA CONSULTADA

BARR D., WARWICK S., DESAULNIERS N.1997. Isozyme variation, morphology, and growth response to temperature in *Pythium irregular*. Canadian Journal of Botany 75(12):2073-2081.

BOUDJEKO T., OMOKOLO N., DRIOUICH A., BALANGÉ A. 2005. Peroxidase and Pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. Journal of Phytopathology 153, 409 – 416.

CHENG W., SCHNEIDER R.1991. Comparisons of soluble proteins and isozymes of seven *Pythium* species and applications of the biochemical data to *Pythium* systematic. *Mycological Research* 95:548-555.

EBERLE R.L., ROTHROCK C.S., SEALY R.D. 2007. The role of the environment and seedling pathogens on rice stand establishment. Pages 158-161 in: *Rice Research Studies 2006*. R.J. Norman, J.F. Meullenet, and K.A.K. Moldenhauer, eds. Arkansas Agricultural Experiment Station Research Series 550.

_____; HOY J., SCHNEIDER R.1992. Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Experimental Mycology* 16: 22-34.

_____; HOY J.1993. Molecular and morphological comparison of *Pythium arrhenomanes* and *P.graminicola*. *Mycological Research* 97:1371-1378.

GARZÓN C., GEISER D., MOORMAN G.2005. Diagnosis and population analysis of *Pythium* species using ALP fingerprinting. *Plant Disease* 89:81-89.

GODFREY S., MONDS R., LASH D., MARSHALL J.2003. Identification of *Pythium oligandrum* using species-specific ITS rDNA PCR oligonucleotides. *Mycological Research* 107:790-796.

HALL T.A.1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.

KAGEYAMA J., OHYMA A., HYAKUMACHI M.1997. Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species –specific primers. Plant Disease 81:1155-1160.

KAGEYAMA K., NAKASHIMA A., KAJIHARA Y. 2005. Phylogenetic and morphological analyses of *Pythium graminicola* and related species. Journal of Genetic Plant Pathology.71:174-182.

LAGUNA I.G., SALAZAR L.G., LÓPEZ J.F. 1983. Enfermedades fungosas y bacterianas de las aráceas de Costa Rica. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 30p.

LEÓN, J. 1987. Botánica de los Cultivos Tropicales, Lima, Perú. Segunda edición. IICA. San José, Costa Rica. 445 p.

LEVESQUE C.A., DE COCK A. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *pythium*. Mycological Research 108: 1363-1383.

MARTIN, F. 2000. Philogenetic relationships among *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrial encoded cytochrome oxidase II gene. Mycological Research 92 (4): 711-727.

MATSUMOTO C., KAGEYAMA K., SUGA H., HYAKUMACHIM. 2000. Intraspecific DNA polymorphisms of *Pythium irregular*. Mycological Research 104:1333-1341.

MOORMAN G., KANG S., GEISER D., KIM S. 2002. Identification and characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. *Plant disease* 86:1227-1231.

MORALES, A. 2007. Cultivo del tiquizque. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 26p

MURRAY M.G., THOMPSON W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8 (19):4321-4325.

NZIETCHUENG S. 1984. *Root rot of Xanthosoma sagittifolium caused by Pythium myriotylum in Cameroon*. In: *Tropical root crops: Production and uses in Africa. Proceedings of the Second Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops*. (Eds. E.R. Terry, E.V. Doku, O.B. Arene & N.M. Mahungu). Douala, Cameroon, pp. 185-188

MUÑOZ, G. 2011. Evaluación de la patogenicidad de diversos aislamientos de *Pythium myriotylum*. Tesis presentada para optar por el grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 50p.

O'HAIR S.K., ASOKAN.M.P. 1986. Edible aroids: botany and horticulture. Horticultural Reviews. 8:43-99.

ONOKPISE O.U., WUTHO J.G., NDZANA X., TAMBONG J.T., MEBOKA M.M., SAMA A.E., NYOCHEMBEN L., AGUEGIA A., NZIETCHUENG S., WILSON J.G., BURNS M. 1999. Evaluation of macabo cocoyam germplasm in Cameroon. Perspectives on new crops and new uses. J.Janick (ed), ASHS Press, Alexandria. 394 – 396.

PACUMBABA R.P., WUTOH J.G., EYANGO S.A., TAMBONG J.T., 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.

PERNEEL M., TAMBONG JT., ADIOBO A., FLOREN C., SABORÍO F., LÉVESQUE A., HÖFTE M. 2006. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. Mycological Research 110 (5): 583-593

POREBSKY S., BAILEY L.G., BAUM B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology. Rep. 15: 8-15.

TAMBONG J.T., POPPE J., HÖFTE M. 1999. Pathogenicity, electrophoretic characterisation and *in planta* detection of the cocoyam root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. European Journal of Plant Pathology 105: 597-607.

TAMBONG J.T., HÖFTE M. 2001. Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA 1. *European Journal of Plant Pathology* 107: 511 – 521.

TAMBONG J., DE COOK A., THINKER N., LÉVESQUE A. 2006. Oligonucleotide array for detection and identification of *Pythium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4):2691-2706.

VAN DER PLAATS-NITERINK A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology* 21. Baarn Netherlands: Central bureau Voor Schimmelcultures.

WANG P.H., WHITE J. 1997. Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:129-143.

WANG P., WANG Y., WHITE J. 2003. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. *Letters in Applied Microbiology* 37:127-132.

CAPÍTULO IV
DISCUSIÓN GENERAL

1. DISCUSION GENERAL

El tiquizque, desde el punto de vista socioeconómico, es de gran importancia para Costa Rica, por ser un cultivo de consumo tradicional en el país y un cultivo de subsistencia para muchos agricultores, pero además por la existencia de un mercado de exportación de fácil acceso, insatisfecho, y que paga altos precios a los productores. Esto último es de especial relevancia porque ofrece a los agricultores de zonas económicamente reprimidas (Zona Huetar Norte y Brunca) una opción productiva altamente rentable.

El tiquizque ganó terreno en el área comercial a partir de mediados de los años ochenta, a partir de 1990, empieza el auge en mayor escala, y se reportan plantaciones planificadas en Pérez Zeledón y Buenos Aires, principalmente. Consecutivamente, las siembras se expandieron hacia los cantones de Corredores, Coto Brus, Golfito, Osa, y San Carlos, y se registro un récord de aproximadamente 10.000 hectáreas en la cosecha 1998-1999. (MAG, 2010). Luego de la cosecha de 1998 el impacto de la enfermedad conocida como “mal seco” tuvo su mayor efecto y la superficie cultivada bajó en un porcentaje significativo (aproximadamente un 40%). A partir de este año en promedio se cultivan 1000 a 3000 hectáreas por año de ambos tipos de tiquizque: morado y blanco. Esta

disminución en el área provocó un desabastecimiento del producto tanto en el mercado nacional como en el de exportación.

Las posibilidades de combatir esta enfermedad son muy reducidas ya que no se conocen variedades resistentes, ni prácticas agronómicas, químicas o biológicas que permitan un control efectivo. Además, la determinación de la etiología ha sido compleja: algunos reportan la existencia de un complejo de patógenos, entre ellos *Erwinia solani*, *Fusarium solani* y diferentes especies de *Pythium*, aunque existe cierto consenso que el agente principal es *Pythium myriotylum* (Perneel et al. 2006).

Estudios previos demuestran la existencia de un posible proceso de especialización en los aislamientos de *P. myriotylum* asociados al tiquizque y proponen llamar a este organismo *P. myriotylum* var. *AraceaeAraceaeerum* (Tambong et al. 1999; Perneel et al. 2006; Gómez et al., 2008); Muñoz et al. 2011). El objetivo de este trabajo fue profundizar en el estudio molecular de este organismo, mediante la comparación de la secuencia de dos de sus genes mitocondriales (COX I; COX II) y un gen nuclear (β -tubulina) con las secuencias de estos genes en aislamientos de *P. myriotylum* provenientes de otros hospederos (sorgo, piña, tabaco, *Gypsophila* sp., frijol), con el fin de conocer con mayor detalle el grado de especialización alcanzado.

Al realizar los alineamientos múltiples para cada una de las secuencias de los tres genes estudiados se encontraron 7 polimorfismos de nucleótido simple, que correspondían todos a sustituciones transicionales. El análisis de máxima parsimonia y máxima verisimilitud, para cada uno de los tres genes, agrupó a los aislamientos de *P. myriotylum* que infectan tiquizque en un grupo único y diferente (con altos valores "bootstrap) del grupo conformado por los aislamientos de *P. myriotylum* de otros hospederos y de otras especies de este género.

Este resultado constituye una evidencia de peso de un posible proceso de especialización por hospedero de los aislamientos de *P. myriotylum* hacia tiquizque y se suma a la obtenida en otros estudios que han mostrado que estos aislamientos muestran diferencias fisiológicas, bioquímicas y moleculares con respecto a los aislamientos de *P. myriotylum* aislados de otras plantas (sorgo, piña, tabaco, *Gypsophila sp.*, frijol) (Tambong *et al.*, 1999; Perneel *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2008); Muñoz *et al.*, 2011).

Varios autores han utilizado las diferencias observados en los análisis filogenéticos para definir nuevas especies. En el 2008 Moralejo *et al.*, clasificaron una nueva especie de *Pythium*, *P. recalcitans*, por medio del gen de la β -tubulina. El COX II ha sido utilizado también para identificar nuevas especies de *Pythium*; por ejemplo, Nechwatal *et al.* (2006), reportan la existencia de *P. phragmitis* que afecta las algas rojas, y Garzon *et al.* (2007), reportaron una nueva especie de *Pythium*, *P. cryptoirregulare*, muy cercana a *P. irregulare* y Morajelo *et al.* (2008), con la ayuda del COXII y otro genes, identificaron la especie *P. recalcitans*.

Por lo tanto, con la evidencia obtenida creemos que la especie de *Pythium myriotylum* que afecta a tiquizque puede ser considerada una especie nueva, que ha sufrido un proceso de especialización por hospedero.

Paralelamente a los resultados anteriores este estudio aporta un método de identificación (PCR-RFLP) más seguro y rápido que el método en uso basado en características morfológicas. Este resultado tiene implicaciones prácticas importantes. El manejo de las enfermedades en los cultivos depende primordialmente de la detección exacta del agente causal. En el caso de *P. myriotylum*, al existir al menos dos tipos de aislamientos, uno patogénico y otro no patogénico al cultivo de tiquizque, y si se considera que el *P. myriotylum* común es un organismo con una presencia frecuente en los suelos tropicales, la detección exacta del tipo de aislamiento presente en un suelo o en una planta específica es de vital importancia para la toma de decisiones sobre el manejo de la enfermedad.

2. LITERATURA CONSULTADA

GARZÓN C., YANEZ J., MOORMANG. 2007. *Pythium cryptoirregulare*, a new species within the *P. irregulare* complex. Mycological, 99(2):. 291–301.

GÓMEZ-ALPÍZAR L., SAALAU E., PICADO I., TAMBONG J.T., SABORÍO F. 2011. "A PCR-RFLP assay for identification and detection of *Pythium myriotylum*, causal agent of the cocoyam root rot disease. Letters in Applied Microbiology, 52(3);185-192.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA (MAG).2010.Plan estratégico de la cadena productiva de raíces tropicales. Costa Rica.

MORALEJO E., CLEMENTE A., DESCALS E.2008. *Pythium recalcitrans* sp. nov. revealed by multigene phylogenetic analysis. Mycological Research 100(2); 310–319.

NECHWATAL J, MENDGEN K .2006. *Pythium litorale* sp. nov., a new species from the littoral of Lake Constance, Germany. FEMS Microbiology Letters 255:96–101

MUÑOZ. G.2011. Evaluación de la patogenicidad de diversos aislamientos de *Pythium myriotylum*. Tesis presentada para optar por el grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 50p.

PERNEEL M., TAMBONG JT., ADIOBO A., FLOREN C., SABORÍO F., LÉVESQUE A., HÖFTE M. 2006. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. Mycological Research 110 (5): 583-593.

TAMBONG J.T.; POPPE J.; HÖFTE, M. 1999. Pathogenicity, electrophoretic characterisation and *in planta* detection of the cocoyam root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. European Journal of Plant Pathology 105: 597-607.