

Identificación de hongos asociados a la pudrición seca del ñame bajo condiciones de almacenamiento

Identification of fungi associated with dry rot disease of yam under storage conditions

Diana Beatriz Sánchez López*, Lily Lorena Luna Castellanos, Abelardo Tulio Díaz Cabadiaz, Jazmín Vanessa Pérez Pazos & Jorge Cadena Torres

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia, Centro de Investigación Colombia.

*Autor de correspondencia: dbsanchez@agrosavia.co

Diana Beatriz Sanchez: <https://orcid.org/0000-0001-9715-4097>

Lily Lorena Luna Castellanos: <https://orcid.org/0000-0003-2172-7842>

Abelardo Tulio Díaz Cabadiaz: <https://orcid.org/0000-0001-5670-3475>

Jazmín Vanessa Pérez Pazos: <https://orcid.org/0000-0002-1889-8248>

Jorge Cadena Torres: <https://orcid.org/0000-0002-5180-2893>

ARTÍCULO ORIGINAL INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Artículo recibido: 29/01/2020
Artículo aceptado: 20/06/2020
En línea: 30/07/2020

PALABRAS CLAVE:

hongos,
Dioscorea,
patógenos,
almacenamiento,
pudrición.

ORIGINAL ARTICLE

ARTICLE INFORMATION
Article received: 29/01/2020
Article accepted: 20/06/2020
On line: 30/07/2020

KEYWORDS:

fungi,
Dioscorea,
pathogens,
storage,
rot.

RESUMEN

La pudrición seca de los tubérculos de ñame es la enfermedad que en la actualidad ocasiona las mayores pérdidas económicas a los pequeños productores asociados a este cultivo en el Caribe colombiano, pues deteriora los tejidos internos del tubérculo, ocasionando la pérdida de su valor comercial y de la semilla. Actualmente, no se tiene certeza de la identidad de los agentes causales, por lo que la presente investigación se llevó a cabo con el objeto de coleccionar, aislar y caracterizar los hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame cv. "Espino" en la región Caribe de Colombia en almacenamiento. El estudio se desarrolló entre los meses de febrero a octubre del año 2019, identificando las zonas productoras de ñame en la región Caribe colombiana y coleccionando en los municipios y veredas, tubérculos en almacenamiento. En el laboratorio se aislaron de las lesiones los hongos asociados y se identificaron a través de la amplificación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del DNA ribosomal, complementado con los genes Calmodulina y β -tubulina 2. En total se aislaron 56 hongos asociados a las lesiones, los cuales fueron agrupados en 10 morfotipos, logrando la clasificación por género y especie de los mismos. De acuerdo con la caracterización realizada se puede definir que las especies DH2-*Lasioidiplodia theobromae*, DH3-*Fusarium solani* y DH6-*Neocosmospora rubicola*, se constituyen como los principales agentes causales de la enfermedad de la pudrición seca de tubérculos de ñame espino en almacenamiento en la región Caribe de Colombia.

ABSTRACT

Dry rot of yam tubers is a disease that currently causes the greatest economic losses to small producers associated with this crop in the Colombian Caribbean, as it deteriorates the internal tissues of tubers, causing loss of its commercial value and the seeds. Currently, we are not certain about the identity of the causal agents, so this research was carried out in order to objective collect, isolate and characterize the fungi associated with the dry rot disease of yam tubers cv. "Espino" in the Caribbean region of Colombia in storage conditions. This study was carried out between February and October 2019, identifying the yam-producing areas in the Colombian Caribbean region and collecting in the municipalities and sidewalks, tubers in storage. In laboratory, the associated fungi were isolated from the lesions and identified through the amplification of the ITS (*Internal Transcribed Spacer*) region of the ribosomal DNA, complemented by the Calmodulin and β -tubulin gene 2. A total of 56 fungi associated with lesions were isolated, which were grouped into 10 morphotypes, achieving their classification by genus and species. According to our results, the species DH2-*Lasioidiplodia theobromae*, DH3-*Fusarium solani*, and DH6-*Neocosmospora rubicola* were identified as the main causal agents associated to dry rot disease of yam tubers under storage conditions in the Colombian Caribbean region.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista agrícola, el ñame (*Dioscorea* sp.) es el tercer tubérculo de mayor importancia a nivel mundial debido a que es un producto clave para la alimentación de las comunidades rurales, además generando fuentes de empleo e ingresos para los pequeños productores. Se cultiva en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, con una producción mundial estimada de 7 258 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 8 351.5 kg ha⁻¹ registrados para el año 2018 (FAOSTAT, 2020). Para Colombia es considerado un producto de alta importancia agrícola, ya que ocupó el segundo lugar en producción en el continente americano con 419 267 toneladas en el año 2018; mientras tanto, en rendimiento ocupó el noveno lugar con 10 459 kg ha⁻¹ (FAOSTAT, 2020). En Colombia este tubérculo se siembra preferencialmente en la región Caribe, en donde se concentra el 95% de producción nacional, principalmente en los departamentos de Córdoba (43%), Sucre (14%) y Bolívar (30%) (MADR, 2015). En la región Caribe, a este cultivo se vinculan alrededor de 20 mil familias, constituyéndose en la fuente principal de ingresos y empleo rural para pequeños y medianos productores, estableciéndose en un producto importante de la agricultura familiar y de la cadena alimentaria (González, 2012; Doncel et al., 2017).

En años recientes, la pudrición seca de los tubérculos se ha registrado como un problema de creciente importancia para los productores y comercializadores del tubérculo en la región Caribe de Colombia. Aunque aún no se han evaluado las pérdidas, algunos agricultores y comercializadores del tubérculo indican que la enfermedad puede ocasionar pérdidas de hasta el 50% de la producción en almacenamiento (Amadioha et al., 2001; Nwankiti y Gwa, 2018). Las principales pérdidas ocurren debido a que los tubérculos, una vez cosechados, se almacenan durante un período de tiempo antes de su comercialización y en este estado se produce la infestación de hongos. Algunos autores sostienen que esta enfermedad

puede iniciar en campo, antes de la cosecha, como hongos que atacan las plantas ocasionando ligeras manchas que las debilitan y deterioran (Folgueras et al., 2011). Se ha reportado que los agentes causales pueden penetrar los tubérculos a través de heridas o daños mecánicos que ocurren en campo durante el manejo del cultivo y durante la cosecha (Adeniji et al., 2020).

Los síntomas se manifiestan en los tubérculos en almacenamiento con daños aparentes en el exterior en algunos casos, pero que en la parte interna muestran una pudrición de los tejidos, los cuales se desintegran y vuelven duros y secos, lo que ocasiona la pérdida de su valor comercial (Dania et al., 2019). En algunos trabajos previos se han observado micelios fúngicos con tejidos de color marrón y bordes circulares o irregulares que muestran una tendencia a dañar el tejido sano (Nahunnaro, 2008). Varios complejos fúngicos han sido reportados, entre los que se mencionan *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Penicillium*, entre otros, los cuales en la literatura se reportan como agentes asociados a pérdidas de productos agrícolas en post-cosecha o almacenamiento (Gwa et al., 2015; Gwa y Ekefan, 2017; Ijato, 2019).

En Colombia no se han realizado estudios relacionados con esta enfermedad y los agentes causales aún son desconocidos. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue coleccionar, aislar y caracterizar los hongos asociados a la pudrición seca de los tubérculos de ñame en almacenamiento en la región Caribe colombiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de tubérculos. A través de fuentes secundarias, se identificaron las principales zonas productoras de ñame en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar en la región Caribe de Colombia (Figura 1) y se realizaron visitas a 34 predios de productores en donde se efectuaron colectas de tubérculos del ñame cv. “Espino”, que se

encontraban en almacenamiento para ser usados como semilla en la siguiente temporada de siembras. Los tubérculos colectados se seleccionaron por presentar síntomas de la afectación, fueron empacados en bolsas de papel kraft y transportados en neveras a una temperatura entre -4 y -8 °C al Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia, ubicado en el municipio de Cereté, departamento de Córdoba,

con coordenadas geográficas: 8°50'79" de latitud Norte y 75°47'58" de longitud Oeste.

Las colectas se realizaron siguiendo los lineamientos de la Resolución No. 1466 del 03 de diciembre de 2014 de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA), que regula en Colombia la colecta de especímenes de la diversidad biológica con fines de investigación.

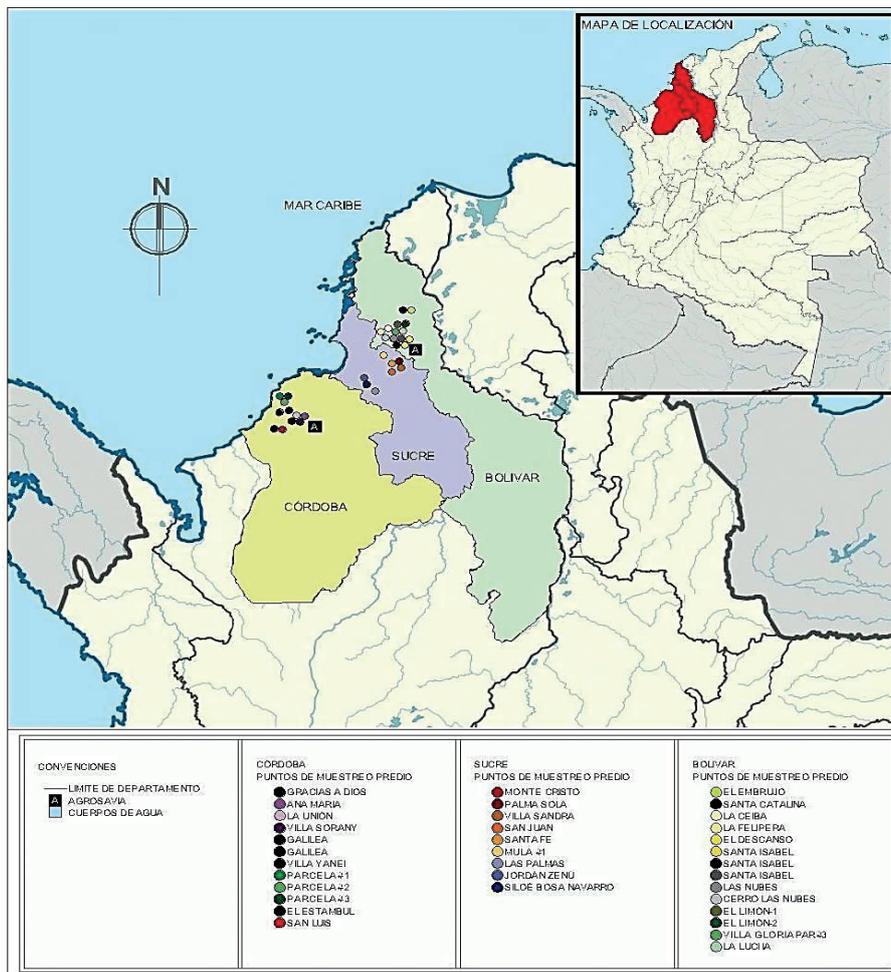


Figura 1. Sitios de colecta de tubérculos de ñame cv. "Espino" con síntomas de la pudrición seca en la Región Caribe de Colombia.

Fuente: elaboración propia.

Aislamientos. En laboratorio se realizó una desinfección superficial del tubérculo con hipoclorito de sodio al 2% y enjuague con agua destilada. Luego se tomaron rodajas de 10-12 mm de grosor del tejido afectado de las regiones basal, media y apical del tubérculo, las cuales se enjuagaron con agua y

detergente durante cinco minutos, y se dejaron en hipoclorito de sodio al 5% durante dos minutos. Posteriormente, se lavaron durante 30 minutos en agua corriente. De las rodajas se tomaron secciones de 1.0 cm², las cuales se sumergieron en alcohol al 70% durante un minuto y se enjuagaron con agua

destilada estéril. Seguidamente, estas secciones fueron sembradas en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)[®] suplementado con amikacina 1.0 mL L⁻¹ para evitar la contaminación por bacterias e incubadas a una temperatura 30 ± 2 °C durante 7 días (Montiel et al., 2016). Para obtener cultivos puros, se realizaron resiembras continuas hasta asegurar la pureza de los aislamientos.

Características macroscópica y microscópica. Los micelios y conidios obtenidos fueron ensamblados en laminas, usando Azul de Lactofenol[®] para su descripción bajo microscopio binocular (DM500 Leica[®], USA). Las descripciones macroscópicas se realizaron teniendo en cuenta la metodología propuesta por Pacasa-Quisbert (2017), en la cual se describieron la coloración, textura, superficie, presencia de exudados y tipo de borde desarrollado por los crecimientos fúngicos (Stehigel, 2000). La caracterización macro y microscópica sirvió de base para la agrupación de los hongos en morfotipos, basado en la similitud de sus características.

Frecuencia de morfotipos. La frecuencia de la distribución de los morfotipos en la zona de estudio se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$F = \frac{ni}{N} \times 100$$

Donde:

ni= número de veces que se presenta un morfotipo.

N=Tamaño total de la muestra.

Caracterización molecular. Para la identificación molecular de los morfotipos se procedió a sembrar los aislados en caldo de papa y dextrosa para obtener micelios, los cuales fueron macerados con nitrógeno líquido para la extracción DNA, siguiendo las instrucciones del fabricante de DNeasy Plant Mini Kit[®] (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

La PCR se realizó amplificando fragmentos de algunos genes como: región ITS1-ITS4, Calmodulina

y β -Tubulina-2. La reacción de PCR se efectuó usando el Kit PCR Master Mix (Thermo Scientific[®], Lucigen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando los siguientes juegos de primers: ITS-1F (ITS-1F 5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3'), ITS-4 (ITS-4R 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (Gardes y Bruns, 1993). El programa de PCR que se utilizó fue el siguiente: desnaturalización inicial 95°C por 3 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos de desnaturalización, 55°C por 30 segundos de alineación, 72°C por 45 minutos de extensión y una extensión final de 72°C por 7 minutos. Para el gen de la Calmodulina se utilizaron los primers (CL1-F5' GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC 3') y (CL2A-R5' TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC O 3') (O'Donnell et al. 2000). El programa de PCR fue el mismo de los ITS, pero la temperatura de alineación se ajustó a 57°C.

Para la β -Tubulina-2 se utilizaron los primers T1 (T1-F 5' AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT 3') y T2 (T2-R 5' TAG TGA CCC TTG GCC CAGT TG 3') (O'Donnell Cigelnik, 1997) con el siguiente programa de PCR: desnaturalización inicial 94°C por 3 minutos, 10 ciclos a 94°C por 30 segundos de desnaturalización, 46°C por 30 segundos de alineación, 72°C por 1 minuto de extensión; 25 ciclos a 94°C por 30 segundos de desnaturalización, 57°C por 30 segundos de alineación, 72°C por 1 minuto de extensión y una extensión final de 72°C por 10 minutos, utilizado el equipo termociclador MiniAmp Plus (Applied Biosystems[™], Singapur, Asia).

La verificación de la calidad de la extracción se realizó corriendo una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE1X en una cámara de electroforesis horizontal Enduro VE20 (Labnet international Inc Taiwán, China). Como revelador se usó EZ-vision[®] (Amresco Inc., USA) y como marcador molecular Gene ruler de 1kb de (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). El gel fue observado en un equipo para análisis y documentación de geles Gel Doc XR (BioRad, USA).

A los productos de la PCR se les realizó un análisis de secuenciación de Sanger en doble sentido en el equipo de electroforesis capilar ABI 3500 (Applied Biosystems®, USA). Las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias de referencia de la base de datos GenBank® del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis filogenético en el software Mega 10 (Versión 10.0.5., State College, USA). Las secuencias se alinearon mediante el programa MUSCLE (*Comparación de secuencias múltiples por Log-Expectation*). La construcción del árbol filogenético se infirió al usar el método de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el modelo Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980) para la región ITS.

RESULTADOS

Número de colectas. Se realizaron un total de 48 colectas de tubérculos de ñame cv. “Espino” en un total de 34 predios en los municipios de San Juan Nepomuceno, Carmen de Bolívar, San Jacinto, Ovejas, Los Palmitos, Sincelejo, San Pelayo y Cereté. Los tubérculos colectados se encontraban en almacenamiento de 3 a 4 meses para ser usados como semilla y presentaban algunos síntomas externos de deterioro a causa de la enfermedad (Figura 2). El deterioro fúngico post cosecha de ñame, a diferencia de la mayoría de las infecciones de plantas individuales, está influenciado por la presencia

simultánea de varios hongos patógenos. En la parte externa de los tubérculos se presentaron grietas de diferente tamaño, observándose parches con podredumbre y con rompimiento y desprendimiento de la corteza externa o cáscara. En varios casos, las lesiones externas de los tubérculos mostraban desintegración o rompimiento del tejido en pequeñas partículas secas. Internamente, los tubérculos presentaban podredumbre seca en diferentes regiones de los tejidos internos con decoloración negra, café oscuro o rosado con bordes amarillos.

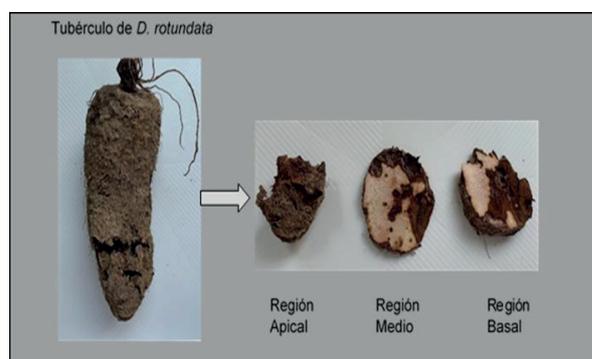


Figura 2. Tubérculos de ñame espino afectado por pudrición seca en la región Caribe de Colombia.

Fuente: elaboración propia.

Morfotipos. La similitud en las características macro y microscópica de los aislamientos permitió la conformación de 10 morfotipos de hongos obtenidos de los tubérculos o semillas de ñame afectados por la enfermedad de la pudrición seca. Las características de los 10 morfotipos se muestran en la (Tabla 1). Es de señalar que el morfotipo DH3, presenta dos colonias con características macroscópicas diferentes (referenciadas como DH3 y DH13), pero que microscópicamente son muy similares.

Tabla 1. Descripción macro y microscópica de 10 morfotipos de hongos aislados de tubérculos de ñame afectados por la enfermedad de la pudrición seca en la región Caribe colombiana.

Morfotipo	Características macroscópicas	Características microscópicas
DH2	Colonia de color gris oscuro, textura lanosa, con micelio aéreo y borde regular.	El micelio es septado, las clamidosporas son intercalares y terminales.
DH3	Macrosópicamente este morfotipo presenta dos (2) características: DH3) Colonias de color blanco con centro de color rosa y borde irregular; DH13) Colonia de coloración rosa en el centro con circunferencias de color violeta y blanca, textura lanosa aterciopelada con una superficie elevada en el centro y borde regular.	Hifas septadas, macroconidias de forma curvada con 2 a 3 septos, las cuales se forman sobre conidióforos que pueden o no ser ramificados. Los microconidios presentan forma de media luna, abundantes y unicelulares.
DH6	Colonia de color blanco, textura lanosa. Borde irregular y crecimiento rápido.	Macroconidias con forma de media luna, presentan aseptados o 1 a 2 septos, ligeramente curvados.
DH9	Colonia de color café, textura lanosa y seca.	Hifas septadas de color café con células fragmentadas que van desde un par hasta varias células de color café.
DH11	Colonia de color grisáceo con esclerocios en el centro de la colonia, textura lanosa con una superficie plana y un borde irregular.	Hifas septadas de color café. Conidióforos con dos a cuatro conidios periformes de color pardo con tres septos transversales.
DH16	Colonia de color negro con anillos de color blanco, textura aterciopelada en el centro y granulosa en el borde, el cual es regular.	Conidióforos simples con cabeza conidial cilíndrica, que sostiene conidios hialinos sub- esféricos y suspendidos en hileras.
DH17	Colonia de color blanco, centro rosa, textura lanosa aterciopelada, superficie elevada en el centro y borde regular.	Hifas con clamidosporas terminales.
DH18	Colonia de color gris, con superficie elevada aterciopelada y borde regular.	Hifas septadas agrupadas. No se observan estructuras reproductivas.
DH20	Colonia de color verde oscuro, textura granulosa, superficie plana y borde regular.	Conidióforo hialino cilíndrico con conidios ovalados, agrupados y de color café.
DH22	Colonia de color verde oliva en el centro con borde blanco y forma irregular.	Conidióforos simples que poseen métulas y fálides que sostienen conidios hialinos, sub- cilíndricos, agrupados en hileras.

Fuente: elaboración propia.

Caracterización molecular. Se realizó la amplificación del ADN de los 10 morfotipos de hongos para la región ITS y, como resultado de la secuenciación de Sanger, se obtuvieron secuencias en sentido Forward y Reverse de los productos PCR de la región ITS. Las secuencias fueron editadas y se obtuvo la secuencia consenso, la cual fue alineada

con secuencias del Genbank® para determinar su identidad. Se identificaron 10 especies de hongos que presentaron la mayor similitud y cobertura con las secuencias de la región ITS, de los morfotipos asociados a la pudrición seca de los tubérculos de ñame (Tabla 2).

Tabla 2. Similitud y cobertura de los morfotipos asociados a la pudrición seca de los tubérculos de ñame espino con especies de hongos.

Identificación	Género y Especies	Cobertura	Similitud	Refseq
DH2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	92%	99,81%	NR 147364.1
DH3	<i>Fusarium solani</i> DH3	96%	97,77%	NR 163531.1
	<i>Fusarium solani</i> DH13	97%	97,78%	NR 163531.1
DH6	<i>Neocosmospora rubicola</i>	96%	97,57%	NR 154227.1
DH9	<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	100%	98,50%	MH861121.1
DH11	<i>Curvularia aerea</i>	89%	100,00%	NR 130689.1
DH16	<i>Aspergillus oryzae</i>	90%	99,47%	NR 135395.1
DH17	<i>Fusarium equiseti</i>	95%	99,45%	NR 121457.1
DH18	<i>Curvularia pseudorobusta</i>	91%	100,00%	NR 130653.1
DH20	<i>Aspergillus niger</i>	91%	99,65%	NR 111348.1
DH22	<i>Penicillium sclerotigenum</i>	90%	100,00%	NR 121246.1

Fuente: elaboración propia.

A partir de lo anterior se obtuvo un árbol filogenético en donde se pudo observar la conformación de cuatro grupos definidos, así: Hypocreales, Botryosphaerales, Eurotiales y Pleosporales (Figura 3). El grupo de los Hypocreales está conformado por los morfotipos DH3, DH6 y DH17, el cual se encuentra con una representación del 50,0% de las muestras colectadas. Este grupo se le conoce comúnmente como complejo *Fusarium* al cual se asocian las especies *Fusarium solani*, *Neocosmospora rubicola* y *Fusarium equiseti*. Las especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC),

ha sido previamente descrita por Santos et al. (2019), mientras que le especie *Fusarium Solani* (FSSC) aparece descrita por Sandoval-Denis et al. (2019).

La representación del grupo de Botryosphaerales se encuentra con un 5,36% de las muestras colectadas, en donde se asocian los morfotipos DH2 (*Lasiodiplodia theobromae*) y DH9 (*Neoscytalidium hyalinum*). Estas especies fueron descritas por Cardoso et al. (2018) y Girona et al. (2019).

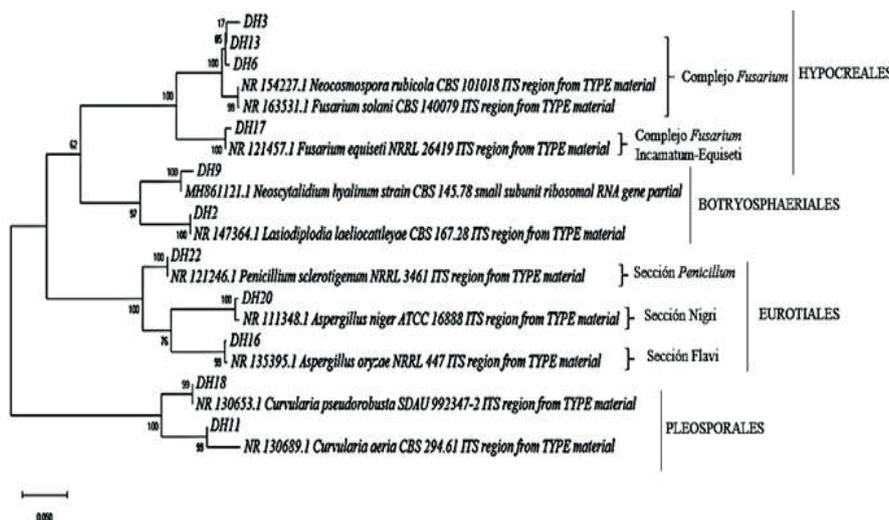


Figura 3. Árbol filogenético conformado por 10 morfotipos de hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame en la región Caribe de Colombia. Arbol generado por el método máxima verosimilitud basado en la región ITS y 11 secuencias de referencia del Genbank®.

Fuente: elaboración propia.

En el grupo de los Eurotiales se presentó una representación del 10,71% de los individuos aislados, en donde los morfotipos asociados al género *Aspergillus* se encuentran distribuidos en tres secciones: el morfotipo DH20 se relaciona con especies pertenecientes a la Sección *Nigri* (Samson et al., 2014). El morfotipo DH16 se relaciona dentro de la sección *Flavi* (Frisvad et al., 2019). El morfotipo DH22 se ubicó en la sección *Penicillium* (Houbraken et al., 2016). Finalmente, dentro de los Pleosporales se ubican los morfotipos DH11 (*Curvularia aerea*) y DH18 (*Curvularia pseudorobusta*) (Li, et al., 2017) y se encuentran con una representatividad del 33,93% de las muestras colectadas.

Complementario a la región ITS, los genes que codifican proteínas se utilizan como marcadores moleculares por la presencia de regiones intrónicas que, generalmente, evolucionan más rápido en comparación con ITS (Raja et al., 2017). Los marcadores de codificación de proteínas β -tubulina 2 (Hibbett et al., 2007) y Calmodulina (Ca) (Samson et al., 2014) se han usado más comúnmente para inferir relaciones filogenéticas entre los hongos (Raja et al., 2017). En esta investigación se utilizaron los marcadores Calmodulina y β -tubulina 2 para

complementar la caracterización molecular de los hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame.

Para el gen de la Calmodulina se obtuvo la amplificación en dos morfotipos de hongos que presentaron bandas superiores a los 750 pb. Para el gen β -tubulina-2 se amplificaron seis morfotipos que presentaron bandas entre los 500 y 700 pb. Para cada morfotipo se obtuvieron secuencias en sentido Forward y Reverse de los productos PCR del gen Calmodulina y β -tubulina 2. Las secuencias fueron editadas y se obtuvo la secuencia consenso la cual fue alineada con secuencias del Genbank® para determinar su identidad. En las Tablas 3 se describen las secuencias con mayor similaridad y cobertura del Genbank® relacionadas con las cepas de hongos asociados a pudrición seca de tubérculos de ñame. Como se observa, de todas las cepas caracterizadas con la región ITS, fue posible amplificar el gen de la Calmodulina para dos de los morfotipos de hongos; mientras que para el gen β -tubulina 2, un total de seis morfotipos de hongos fueron posibles. No fue posible amplificar con estos marcadores los morfotipos DH2, DH11 y DH18.

Tabla 3. Porcentaje de Similaridad y cobertura de las secuencias de los morfotipos de hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame en la región Caribe de Colombia. Similaridad y cobertura con los disponibles en la base de datos NCBI a partir del gen Calmodulina y β -tubulina 2. Fuente: elaboración propia.

Gen Calmodulina				
Identificación	Género Especies	Cobertura	Similaridad	Refseq
DH16	<i>Aspergillus oryzae</i>	100%	97,94%	MG826016.1
DH20	<i>Aspergillus niger</i>	98%	99,18%	LC425338.1
Gen β -tubulina 2				
Identificación	Especies	Cobertura	Similaridad	Refseq
DH3	<i>Fusarium solani</i>	98%	98,32%	MF662660.1
DH6	<i>Neocosmospora rubicola</i>	98%	99,25%	KM232061.1
DH9	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	98%	98,91%	KF720786.1
DH13	<i>Fusarium solani</i>	97%	98,70%	MF662660.1
DH17	<i>Fusarium equiseti</i>	92%	99,47%	KU938967.1
DH22	<i>Penicillium sclerotigenum</i>	69%	98,93%	AY674393.1

Frecuencia. La frecuencia permitió determinar los morfotipos con mayor representatividad en las muestras colectadas con afectaciones de pudrición

seca en las zonas productoras de ñame en la región Caribe de Colombia. Se evidencia en la Figura 4 que los morfotipos DH2, correspondiente a

la especie *Lasiodiplodia theobromae* y DH3, a *Fusarium solani*, presentaron los mayores valores de frecuencia, indicando que son los hongos que con mayor frecuencia se presentan asociados a la pudrición seca de los tubérculos de ñame espino en la región Caribe en Colombia. Estos resultados indican que probablemente estos dos hongos son los principales agentes causales de la enfermedad en esta región. En menor proporción se presenta el morfotipo DH6, correspondiente a la especie *Neocosmospora rubicola*, también considerado como posible agente causal primario de esta enfermedad. Los restantes morfotipos de hongos se encuentran en frecuencias mucho menores que los anteriores, por lo cual no se consideran aquí como principales agentes causales.

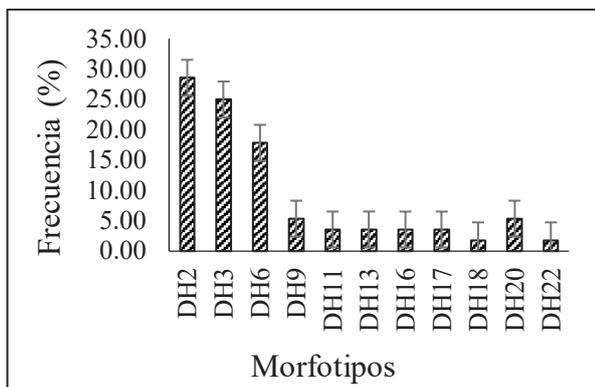


Figura 4. Porcentaje de frecuencia de los morfotipos de hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame.

Fuente: elaboración propia.

Se presenta alguna controversia en cuanto al sitio del tubérculo con la mayor probabilidad de infección por los patógenos, por lo que se realizó una determinación de la frecuencia de la presencia de los morfotipos en las secciones basal, media y apical de los tubérculos. Los resultados se muestran en la Figura 5, donde se observa que la región basal del tubérculo de ñame, correspondiente al sitio de unión con la planta madre, es la sección donde se presentó la mayor incidencia de los patógenos aislados. En esta sección se presentan con mayor frecuencia los morfotipos DH2 (*Lasiodiplodia theobromae*), DH6 (*Neocosmospora rubicola*), con 12,50%, en ambos casos y DH3 (*Fusarium solani*) con un 8,93%. En la sección media y apical por su parte, los morfotipos DH2 (*Lasiodiplodia theobromae*) y DH3 (*Fusarium solani*), presentaron las mayores frecuencias con un comportamiento similar en ambas secciones. Los anteriores resultados parecen indicar que el probable sitio de infección de los hongos patógenos asociados a la pudrición seca es la sección basal de los tubérculos de ñame lo cual corresponde al sitio de unión con la planta madre. Lo anterior parece corroborar lo indicado por algunos autores que sostienen que esta enfermedad podría iniciarse en campo, antes de la cosecha, como hongos que atacan las plantas (Folgueras et al., 2011).

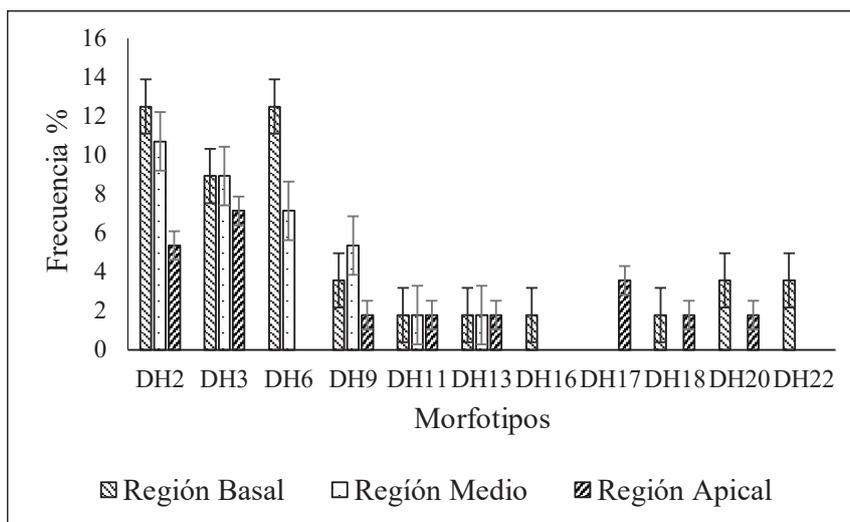


Figura 5. Porcentaje de frecuencia de hongos asociados a la pudrición seca en las regiones basal, media y apical de los tubérculos de ñame.

Fuente: elaboración propia.

DISCUSIÓN

De las colectas de tubérculos en almacenamiento, realizadas en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar se obtuvieron un total 56 crecimientos fungicos, de los cuales se pudieron identificar un total de 10 morfotipos. A través de la amplificación de la región ITS del DNA ribosomal, complementado con los genes Calmodulina y β -tubulina 2 se pudieron identificar un total de 10 especies de hongos asociadas a la pudrición seca de los tuberculos. Estas especies fueron *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*, *Neocosmospora rubicola*, *Neoscytalidium hyalinum*, *Curvularia aerea*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium equiseti*, *Curvularia pseudorobusta*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sclerotigenum*. De las anteriores especies, las que se presentaron con mayor frecuencia en las colectas realizadas fueron *L. theobromae*, *F. solani* y *N. rubicola*, constituyéndose como los principales agentes causales de la pudrición seca del tubérculo del ñame en la región Caribe de Colombia.

Lasiodiplodia theobromae se presentó con una frecuencia 28,57%, encontrándose en los municipios de Sincelejo, San Juan Nepomuceno, San Jacinto, Los Palmitos y Carmen de Bolívar. Según se ha reportado en la literatura, este es un hongo de alta importancia patogénica debido a que tiene la capacidad para secretar la enzima poligalacturonasa que digiere o descompone los componentes de la pared celular de los tejidos infectados (Turner y Ogundana, 1983). Esta especie se encuentra reportada como un patógeno de alta importancia, pues causa enfermedades en una gran diversidad de plantas y presenta una amplia distribución mundial, especialmente prevalente en las regiones tropicales y subtropicales, con una alta capacidad de virulencia (Dania et al., 2019; Chukunda y Onyeizu, 2019). Se indica que este hongo sobrevive de una temporada de cultivo a la siguiente en el suelo y los tejidos de plantas hospederas, lo cual ocasiona la reinfección de cultivos sembrados en terrenos con registros previos de la enfermedad. Lo anterior es corroborado por estudios de Markson et al. (2017), quienes indican que este

hongo puede sobrevivir en el tejido infectado hasta por más de ocho meses. En Colombia, se reportó en tubérculos de ñame por Arrieta et al. (2020) quienes clasifican a *L. theobromae* dentro de las seis especies asociadas con la enfermedad seca de los tubérculos del ñame en la zona costanera del departamento de Córdoba. Por otro lado, nuestros resultados indican que, aunque el hongo *L. theobromae* se encuentra en todas las secciones del tubérculo, su presencia es más frecuente en la parte basal, lo cual corrobora lo expuesto por Folgueras et al. (2011), quienes sostienen que esta enfermedad puede iniciar en campo, antes de la cosecha, como hongos que atacan las plantas madre, con posterior infección de los tubérculos. Asimismo, Otusanya (2018) informa que la porción basal comúnmente denominada como “cabeza” de los tubérculos de ñame, especialmente en el ñame guinea blanco (*D. rotundata*), son más “resistentes” a enfermedades que las regiones media o apical y se prefieren naturalmente como material de siembra, ya que brotan fácilmente en un corto tiempo en almacenamiento y tienen menos probabilidades de pudrirse después de plantar en el campo.

El hongo *Fusarium solani* presentó en estos estudios dos morfologías macroscópicas con porcentajes de aparición de un 25,0% en el morfotipo DH3 y del 3,57% en el morfotipo DH13, presentándose, principalmente, en los municipios de San Juan Nepomuceno, San Jacinto, Ovejas, Los Palmitos y Cereté. Este hongo se encuentra reportado con alta frecuencia de disseminación en campo, presentándose en los cultivos de ñame y por ende en los tubérculos (Montiel et al., 2016). Asimismo, en estudios realizados por Gwa y Richard (2018), se indica que *F. solani* se encuentra incluido entre uno de los hongos que causa con más prevalencia en la pudrición de la región basal y apical del tubérculo de ñame. Por otra parte, al realizar las pruebas de patogenicidad en tubérculos de ñame, este hongo ha demostrado ser extremadamente virulento, causando pudrición tanto en la región basal como apical del tubérculo. De igual forma, Adeniji et al. (2020) informa que *F. solani* se encuentra dentro del grupo de hongos que

Rev. Investig. Altoandín. 2020; Vol 22 Nro 3 199-214

causan podredumbre a los tubérculos, dificultando la posibilidad de exportación y amenazando la seguridad alimentaria. En otras especies de ñame comestible como *Dioscorea esculenta*, Prasannath y Karunakaran (2018) reportan a *F. solani* como agente causal de la pudrición seca de tubérculos de ñame, con características macroscópicas y microscópicas similares a los aislados DH3 y DH13 del presente estudio.

El tercer hongo en importancia en estos estudios fue *Neocosmospora rubicola*, el cual presentó un porcentaje de frecuencia del 17,86%, presente en los tubérculos colectados en los municipios de Ovejas, San Jacinto, Los Palmitos, San Pelayo y Cereté. Dicho hongo se encuentra reportado por Riaz et al. (2018) causando pudrición del tallo de la papa, siendo una amenaza emergente en las regiones productoras Pakistán. De la misma manera, Sepehrnoos et al. (2018) informan que, con base en los caracteres morfológicos y los datos de la secuencia de DNA, se pudo confirmar a *N. rubicola* como agente causal de la pudrición o chancro en plantas de papa. Este hongo se ha encontrado ampliamente distribuido ocasionando daños de diversos grupos de plantas en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Sandoval-Denis et al., 2018).

Otros hongos, encontrados con menor frecuencia en las colectas realizadas en la región Caribe fueron *Neoscytalidium hyalinum*, *Curvularia aerea*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium equiseti*, *Curvularia pseudorobusta*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sclerotigenum*, los cuales se consideran agentes causales de orden secundarios en estos estudios.

El hongo *N. hyalinum* posee características morfológicas que, según estos estudios, coinciden con las descritas por Nouri et al. (2018) para *Neoscytalidium dimidiatum*, obtenido de diversos chancros, frutas infectadas y brotes. Asimismo, Al Raish et al. (2020) informan que en estudios realizados en árboles de *Delonix regia* afectados con la enfermedad de chancro del tallo, se aislaron

N. dimidiatum DSM 109897 de tejidos enfermos. En nuestro estudio, el porcentaje frecuencia de este hongo fue del 5,36%, presente en los municipios de Cereté, Los palmitos y San Juan Nepomuceno. Por otra parte, Lin et al. (2017) reportan la presencia del hongo *N. dimidiatum* en cultivos de *D. esculenta* Lour. afectando también hojas y tallos, con manchas marrones oscuras que ocasionan la marchitez de las partes superiores de la planta.

El hongo *Aspergillus niger* en nuestro estudio presentó un porcentaje de frecuencia del 5,36%, registrándose en los municipios de Carmen de Bolívar, Los palmitos y Sincelejo. Con respecto a este hongo, Gwa y Richard (2018) han reportado aislamientos en tubérculos de ñame afectados por pudrición del tubérculo; Por su parte, Patrice et al. (2017) reportan a *A. niger* como uno de los hongos más severos, causante de la pudrición en almacenamiento, ocasionando pérdidas entre 25-60%. Samuel et al. (2018) también coinciden que los hongos de este género causan pérdidas económicas y reducción de la vida útil en almacenamiento, en raíces y tubérculos.

Investigaciones realizadas por Otusanya et al. (2016) asocian la alta incidencia y severidad de los hongos *A. niger* y *L. theobromae* con la nutrición del cultivo, en especial con las deficiencias de calcio. Al respecto indican que las aplicaciones de carbonato de calcio mejoraron la resistencia contra estas enfermedades y redujeron la pérdida de peso en los tubérculos.

Los hongos *Curvularia aerea*, *Aspergillus oryzae* y *Fusarium equiseti* presentaron un porcentaje de frecuencia de un 3,57% en las muestras colectadas. Nayab y Akhtar (2016) reportan a *C. aerea* como causante de enfermedades de manchas foliares en tomate. Mientras tanto, *Aspergillus oryzae* es reportado por Frank y Kingsley (2014) quienes en sus investigaciones reportan pérdidas de tubérculos en almacenamiento por podredumbre fúngica, e indican que este hongo produce metabolitos secundarios como ácido kójico y ácido ciclopiazónico, que causa deterioro en los tubérculos

(Abarca et al., 2000). Por otra parte, Ezrari et al. (2020) informan la presencia del hongo *F. equiseti* en muestras de calabacín (*Cucurbita pepo* L.), mostrando podredumbre típica de este hongo e identificándolo con la amplificación de la región ITS del ribosoma del DNA ribosomal y usando cebadores ITS1 / ITS4.

Por su parte, los hongos *Curvularia pseudorobusta* y *Penicillium sclerotigenum* presentaron una frecuencia baja (1,79%) en la región basal del tubérculo, su incidencia se registró en los municipios de Carmen de Bolívar y Sincelejo, respectivamente. En estudios adelantados por Sowley et al. (2019) se describe el aislamiento de *P. sclerotigenum* en tubérculos de *D. rotundata* con signos de pudrición. En revisiones de literatura por Frisvad et al. (2018) reporta que *P. sclerotigenum* se encuentra relacionado como una de las especies productoras de patulina, la cual es una micotoxina que afecta diversos productos alimenticios como a las frutas, legumbres y cereales (Zhu et al., 2016; Cotton et al., 2020; Sajid et al., 2020). Este hongo presenta metabolitos secundarios no volátiles, la patulina que produce toxicidad aguda y crónica, principalmente genotoxicidad e inmunotoxicidad, así como citotoxicidad en humanos (Zhou et al., 2018).

CONCLUSIONES

La enfermedad conocida en Colombia como pudrición seca de los tubérculos de ñame está asociada a una variedad de hongos, los cuales pueden ser agrupados en 10 morfotipos con identidad de los estudios morfológicos y filogenéticos a las siguientes especies: *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*, *Neocosmospora rubicola*, *Neoscytalidium hyalinum*, *Curvularia aerea*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium equiseti*, *Curvularia pseudorobusta*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sclerotigenum*. De acuerdo con la caracterización realizada se puede definir que las especies *L. theobromae*, *F. solani* y *N. rubicola*, asociadas a los morfotipos DH2, DH3 y DH6, se constituyen como los principales agentes causales de la enfermedad de la pudrición seca de tubérculos de ñame espino en almacenamiento en la

región Caribe de Colombia, dado que se presentan con mayor frecuencia en las muestras colectadas.

Los anteriores resultados de investigación dan una base para continuar con las pruebas de patogenicidad para, posteriormente, estudiar recomendaciones de manejo que contribuyan a disminuir su incidencia en los tubérculos en almacenamiento.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombiano bajo el convenio número TV18 con AGROSAVIA, laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Turipaná. Este trabajo formó parte del proyecto “Desarrollo de tecnologías para el manejo y producción de semillas de calidad para mejorar la uniformidad y productividad del cultivo ñame de la región Caribe”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G., Accensi, F., & Cabañes, F. J. (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(2), S63-S68.
- Adeniji, A., Taiga, A., & Ayodele, M. S. (2020). Comparative Studies on the Susceptibility of Three Tubers of *Dioscorea* Species to Dry Rot in Anyigba, Kogi State. *International Annals of Science*, 8(1), 70-74. <https://doi.org/10.21467/ias.8.1.70-74>
- Al Raish, S. M., Saeed, E. E., Sham, A., Alblooshi, K., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2020). Molecular characterization and disease control of stem canker on Royal Poinciana (*Delonix regia*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in the United Arab Emirates. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1033. <https://doi.org/10.3390/ijms21031033>
- Amadioha, A. C. (2001). Fungitoxic effects of some leaf extracts against *Rhizopus oryzae* causing *Rev. Investig. Altoandin.* 2020; Vol 22 Nro 3 199-214

- tuber rot of potato. *Archives of Phytopathology & Plant Protection*, 33(6), 499-507. <https://doi.org/10.1080/03235400109383372>
- Arrieta-Guerra, J.J., Díaz-Cabadiaz, A.T., Pérez-Pazos J.V., Cadena-Torres, J., & Sánchez-López, D.B. (2020). Hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame en Colombia.
- Cardoso, J. E., Viana, F. M. P., & Martins, M. V. V. (2018). Doenças causadas por fungos da família *Botryosphaeriaceae* em cajueiro. *Embrapa Agroindústria Tropical-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- Coton, M., Bregier, T., Poirier, E., Debaets, S., Arnich, N., Coton, E. y Dantigny, P. (2020). Production and migration of patulin in *Penicillium expansum* molded apples during cold and ambient storage. *International Journal of Food Microbiology*, 313, 108377. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108377>
- Chukunda, F. A., & Onyeizu, U. R. (2019). Influence of culture media, temperature and light/darkness on the mycelial growth of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.). *Greenerr Journal of Agricultural Sciences*, 9(1), 113-118. <http://doi.org/10.15580/GJAS.2019.1.031419046>
- Dania, V. O., Fadina, O. O., Ayodele, M., & Kumar, P. L. (2019). Distribution and virulence of fungal species isolated from yam (*Dioscorea* spp.) tubers in three agroecological zones of Nigeria. *International Journal of Pest Management*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1629041>
- Doncel, P., & Pérez-Cordero, A. (2017). *Burkholderia cepacia* aisladas de variedades de ñame con actividad antimicrobiana contra *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 9(S), 31-38. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.nS.2017.518>
- Ezrari, S., Lahlali, R., Radouane, N., Tahiri, A., & Lazraq, A. (2020). First report of *Fusarium equiseti* causing pre-and postharvest fruit rot on zucchini in Morocco. *Journal of Plant Pathology*, 102(1), 251-251. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00389-1>
- FAOSTAT-Organización para las naciones unidas para alimentación y agricultura FAO. (2018) [Fecha de consulta: abril 14 de 2020]. Base de datos disponibles [http:// http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC](http://http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC).
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368-376.
- Folgueras, M; J.E. González y A. Dávila. (2011). Principales problemas fitosanitarios del ñame. En: CD-ROM: Plátanos, Bananos, Raíces, Rizomas, Tubérculos y Papaya. Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT).
- Frank, C. O., & Kingsley, C. A. (2014). Role of Fungal rots in post-harvest storage losses in some Nigerian varieties of *Dioscorea* species. *Microbiology Research Journal International*, 343-350.
- Frisvad, J. C. (2018). A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), 73-100. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2294>
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Nováková, A., Chen, A. J., ... & Samson, R. A. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in mycology*, 93, 1-63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
- Gardes, M., & Bruns, T.D (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Girona, M. I. A., Rosa, D. R., & Herrera, C. J. L. (2019). Identification, pathogenicity and distribution of the causal agents of dieback in avocado orchards in Spain. *Spanish journal of agricultural research*, 17(1), e1003. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019171-13561>
- González, V.M.E. (2012). El Ñame (*Dioscorea*

- spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 05-15.
- Gwa, I. V., Bem, A. A., & Okoro, J. K. (2015). Yams (*Dioscorea rotundata* Poir and *D. alata* Lam.) fungi etiology in Katsina-ala local government area of Benue state, Nigeria. *Journal of Phytopathology and Plant Health*, 3, 38-43.
- Gwa, V. I., & Ekefan, E. J. (2017). Fungal Organisms Isolated from Rotted White Yam (*Dioscorea rotundata*) Tubers and Antagonistic Potential of *Trichoderma harzianum* against *Colletotrichum* Species. *Agri Res & Tech: Open Access J*, 10(3), 555787. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.10.555787>
- Gwa, V. I., & Richard, I. B. (2018). Susceptibility of White Yam (*Dioscorea rotundata* Poir) Tuber to Rot Fungi and Control with Extracts of *Zingiber officinale* Rosc. *Azadirachta indica*, 9(9), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000452>
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Lumbsch, H. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.
- Houbraken, J., Wang, L., Lee, H. B., & Frisvad, J. C. (2016). New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36, 299. <http://doi.org/10.3897/mycokeys.34.25974>
- Ijato, J. Y. (2019). Fungal pathogens of yam (*Dioscorea rotundata* Poir) and their bio-control. *Life Science Journal*, 16(9), 92-94 <http://doi.org/10.7537/marslsj160919.11>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Li, J., Jeewon, R., Luo, Z., Phookamsak, R., Bhat, D. J., Mapook, A., ... & Hyde, K. D. (2017). Morphological characterization and DNA based taxonomy of *Fusiconidium* gen. nov. with two novel taxa within Melanommataceae (Pleosporales). *Phytotaxa*, 308(2), 206-218. <http://doi.org/10.11646/phytotaxa.308.2.2>
- Lin, C. H., Chen, Y. X., Liu, W. B., Wu, W. Q., Miao, W. G., & Zheng, F. C. (2017). First report of *Dioscorea esculenta* dieback caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in China. *Plant Disease*, 101(7), 1320. <http://org/doi/10.1094/PDIS-02-17-0167-PDN>
- MADR. (2015). Anuario estadístico del sector agropecuario, resultados evaluaciones municipales. Colombia. <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11438/8507>
- Markson, A.A.A, Omosun, G., Umana, E.J, Amadioha, A.C y Udo, S.E. (2017). Potencia de fungicidas de origen vegetal contra un patógeno de pudrición del ñame blanco (*Dioscorea rotundata* Poir). *Journal of Advances in Microbiology*, 5(3), 1-9. <http://org/doi/10.9734/JAMB/2017/35718>
- Montiel, M. D. L. C. F., Isla, L. H., & Romero, L. M. (2016). Microorganismos fitopatógenos y asociados a tubérculos de cultivares de ñame (*Dioscorea* spp.). *Agricultura Tropical*, 2(1), 61-68.
- Nahunnaro, H. (2008). Effects of different plant extracts in the control of yam rot induced by *Rhizopus stolonifera* on stored yam (*Dioscorea* sp.) in Yola, Adamawa state, Nigeria. *Agricultural Journal*. 3:382-387.
- Nayab, M & Akhtar, N (2016). First Report of *Curvularia aerea* Causing Leaf Spot of *Ficus religiosa* in Pakistan. *American Phytopathological Society*, 100(2), 2530. <http://org/doi/10.1094/PDIS-05-16-0650-PDN>
- Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Yaghmour, M. A., Michailides, T. J., & Trouillas, F. P. (2018). *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot blight and fruit rot of almond in California. *Plant disease*, 102(8), 1638-1647. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1967-RE>.
- Nwankiti, A. O & Gwa, V. I (2018). Evaluation of antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* causal agent of *Rev. Investig. Altoandín*. 2020; Vol 22 Nro 3 199-214

- white yam (*Dioscorea rotundata* Poir) tuber rot. *Nessa Journal of Agricultural Science and Research*, 1(6), 1-12.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella* fujikuroi species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61-78. <https://doi.org/10.1007/BF02464387>
- Otusanya, M. O. (2018). Infection in Tuber Head, Middle and Tail by *Rhizopus Stolonifer* (Ehrenb.) Lind in Relation to Calcium Content in *Dioscorea Rotundata* Poir. *Int J Plant Stu*, 1(1), 1-4.
- Otusanya, M.O., Enikuomelin, O., Popoola, A., Adetunji, M., Kehinde, O., et al. (2016) Effects of Calcium Fertilization on the Susceptibility of *Dioscorea* Species to the Yam Storage Pathogens *Aspergillus Niger* van Tiegh and *Botryodiplodia Theobromae* Pat. *Journal of Plant Physiology & Pathology*,4:3. <https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000155>
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus fusariumAre nonorthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*,7(1),103-116. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., VINO-NINA, L., & Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K iphak iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2-25.
- Patrice, A. K. Francis, K. S. Y. K Théophile, A. S. Fatoumata, F. & Diallo H. A. (2017). Effects of three aqueous plant extracts in the control of fungi associated with post-harvest rot of yam (*Dioscorea alata*). *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*,11(3), 77-87.
- Prasannath, K., & Karunakaran, S. (2018). Study on the Identification of Fungal Pathogen Causing Yam Rot in Lesser Yam (*Dioscorea esculenta*) in Batticaloa District, Sri Lanka. *International Journal of Research Publications*, 4(1), 1-4. http://ijrp.org/paper_detail/152
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770. <http://org/doi/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Reina, Y. (2012). El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Banco de la República-Economía Regional. https://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/dtser_168.pdf
- Riaz, M., Shah- Hussain, M., Nawaz, Z., Tahir, A., Shahzadi, L., Bashir, A., Nawaz-Khan, S. (2020). Influence of abiotic factors on growth and sporulation of *Neocosmospora rubicola* associated with stem rot of potato in Punjab, Pakistan. *Mycopath*,16(2), 87-90.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ... & Varga, J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, *Studies in mycology*, 78, 141-173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Samuel, T. O., Ebabhi, A. M., & Kadiri, A. B. (2018). Effect of Fungal Infection on the Anatomical Integrity of Cells of Some Selected Tubers (*Colocasia esculenta*, *Dioscorea alata* and *Ipomoea batatas*). <https://dx.doi.org/10.19240/njpas.2018.A13>
- Sandoval-Denis, M., Lombard, L., & Crous, P. W. (2019). Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43(1), 90-185. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.04>
- Sandoval-Denis, M., Swart, W. J., & Crous, P. W. (2018). New *Fusarium* species from the Kruger National Park, South Africa. *MycKeys*, (34), 63-92. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.34.25974>
- Sajid, M., Mehmood, S., Yuan, Y., & Yue, T. (2019). Mycotoxin patulin in food matrices: occurrence

- and its biological degradation strategies. *Drug metabolism reviews*, 51(1), 105-120. <https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1589493>
- Santos, A.C.D.S., Trindade, J.V.C., Lima, C.S., Barbosa, R.D.N., da Costa, A.F., Tiago, P.V., & de Oliveira, N. T. (2019). Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with insects in Brazil. *Mycologia*, 111(2), 244-259. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1573047>
- Sepehrnoos H, S., Amini, J., & Abdollahzadeh, J. (2018). Morphological and Molecular Study of Fungi Isolated from Potato Crown, Root and Tuber in Kurdistan. *Province*, 3(7), 47-66. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia68-2016-0163>
- Sowley, E.N.K., Kankam, F., & Nsarko, R.M. (2019). Evaluation of efficacy of false yam (*Icacina oliviformis*) as surface protectant against rot pathogens of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Ghana Journal of Agricultural Science*, 54(1), 1-9. <https://dx.doi.org/10.4314/gjas.v54i1.1>
- Stchigel, A. M. (2000). *Estudio taxonómico de los Ascomycetes del suelo*. (Tesis Doctoral). Universitat Rovira I Virgili. Cataluña, España.
- Turner, J.G., Ogundana, S.K (1983). Production of yam cell-wall degrading enzymes by *Botryodiplodia theobromae*. *Transactions of British Mycological Society*, 80(1), 163-166.
- Zhou, T., Wang, X., Luo, J., Ye, B., Zhou, Y., Zhou, L., et al. (2018). Identification of differentially expressed genes involved in spore germination of *Penicillium expansum* by comparative transcriptome and proteome approaches. *MicrobiologyOpen*, 7(3), 1-13. <https://doi.org/10.1002/mbo3.562>
- Zhu, Y. Y., Yu, J., Brecht, J. K., Jiang, T. J., & Zheng, X. L. (2016). Pre-harvest application of oxalic acid increases quality and resistance to *Penicillium expansum* in kiwifruit during postharvest storage. *Food Chemistry*, 190, 537-543. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.001>