



Hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.) en Córdoba, Colombia¹

Fungi associated with dry rot disease of yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) tubers in Cordoba, Colombia

Jhony José Arrieta-Guerra², Abelardo Tulio Díaz-Cabadiaz³, Jazmín Vanessa Pérez-Pazos³,
Jorge Cadena-Torres³, Diana Beatriz Sánchez-López³

¹ Recepción: 2 de junio, 2020. Aceptación: 18 de abril, 2021. 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 de ñame de la región Caribe", financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural bajo el convenio número TV19 de 2019, y se llevó a cabo en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro Investigación Turipaná, Montería, Córdoba, Colombia.

² Universidad de Córdoba. Carrera 6 No. 76-106, Montería-Córdoba, Colombia. jhonyjosearrieta Guerra@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-1492-8876>).

³ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA, Centro de Investigación Turipaná. Km 13 Vía Montería-Cereté, Colombia. adiazc@agrosavia.co (<https://orcid.org/0000-0001-5670-3475>), jvperez@agrosavia.co (<https://orcid.org/0000-0002-1889-8248>), jcadena@agrosavia.co (<https://orcid.org/0000-0002-5180-2893>) y dbsanchez@agrosavia.co (autor para la correspondencia; <https://orcid.org/0000-0001-9717-4097>).

Resumen

Introducción. La pudrición seca es una enfermedad que ha adquirido gran importancia en Colombia debido a que ocasiona la pérdida de los tubérculos del ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.), tanto en campo como en almacenamiento, afecta los ingresos económicos y la productividad de los pequeños productores. Es escasa la información respecto a los agentes causales de esta enfermedad, por lo que no se tienen claras las estrategias para el manejo de esta problemática. **Objetivo.** Identificar y caracterizar hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame. **Materiales y métodos.** Esta investigación se realizó entre marzo y octubre del año 2019, en la zona costanera del departamento de Córdoba en el Caribe colombiano. Se colectaron tubérculos de ñame en almacenamiento, debido a que los agricultores los conservan como semillas para próximas cosechas. En laboratorio se aislaron de las lesiones los hongos asociados, se caracterizaron y luego se identificaron a través de la amplificación de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) del DNA ribosomal. **Resultados.** Se aislaron veintiocho crecimientos fúngicos asociados a la pudrición seca de los tubérculos del ñame, los cuales se agruparon en once morfotipos, de los cuales se identificaron diez especies, pertenecientes a nueve géneros fúngicos. **Conclusión.** Seis hongos podrían estar asociados a la pudrición seca de los tubérculos de ñame en la zona costanera de Colombia. Estos serían: *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*, *Rhizopus oryzae*, *Neocosmospora rubicola*, *Neoscytalidium dimidiatum* y *Curvularia aerea*.

Palabras claves: enfermedades, almacenamiento, post-cosecha, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*.



Abstract

Introduction. Dry rot is a disease that has acquired great importance in Colombia because it causes losses in yam (*Dioscorea rotunda* Poir.) tubers, both in the field and in postharvest, affecting the economic income and productivity of smallholders. Information on the causal agents of this disease is scarce, so the strategies for managing this problem are unclear. **Objective.** To identify and characterize fungi associated with the dry rot disease of yam tubers. **Materials and methods.** This research was carried out between March and October 2019, in the coastal zone of the Córdoba department in the Colombian Caribbean. Yam tubers were collected in storage, due to the fact that farmers keep them as seeds for future harvests. In the laboratory, the associated fungi was isolated from the lesions, characterized, and then identified through the amplification of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the ribosomal DNA. **Results.** Twenty-eight fungal growths associated with dry rot of yam tubers were isolated and grouped into eleven morphotypes of which ten species were identified, belonging to nine fungal genera. **Conclusion.** Six fungi could be associated with the dry rot of yam tubers in the coastal zone of Colombia. These would be: *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*, *Rhizopus oryzae*, *Neocosmospora rubicola*, *Neoscytalidium dimidiatum*, and *Curvularia aerea*.

Keywords: diseases, storage, postharvest, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*.

Introducción

El ñame espino (*Dioscorea rotundata*) es una planta perenne que forma tubérculos comestibles, lo cual le confiere una alta importancia económica para muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo (Arya et al., 2019; Shiriki et al., 2015). La familia a la cual pertenece el ñame está constituida por seis géneros, entre los cuales se encuentra el género *Dioscorea* que comprende alrededor de seiscientas especies; con especies comestibles como: *D. alata*, *D. rotundata*, *D. esculenta*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. floribunda* y *D. composita* (Coursey, 1967; Pursglove, 1972). Colombia es un importante productor de ñame en regiones tropicales, con una producción anual de aproximadamente 422 063 t (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017), sus cultivos se extienden principalmente por la región Caribe, en donde pequeños productores se dedican a esta actividad. Se calcula que aproximadamente 20 000 familias dependen de esta planta para su sustento diario y el departamento de Córdoba es el más importante (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018).

El ñame es atacado durante su período de cultivo por muchos patógenos, algunas de los cuales afectan los tubérculos producidos. Una de las enfermedades que en los años recientes ha adquirido especial importancia en Colombia, es la conocida como la pudrición seca de los tubérculos. Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de la integridad física de los tubérculos, los cuales se secan, endurecen y se vuelven inutilizables para el consumo en fresco o la siembra. Los síntomas más comunes son tubérculos agrietados que en su interior presentan tejidos duros y secos, con coloración café y marrón. En la literatura mundial se mencionan como posibles agentes causales los géneros fúngicos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Lasiodiplodia*, los cuales están asociados a pérdidas de productos agrícolas en post-cosecha o almacenamiento (Adeniji et al., 2020; Gwa & Ekefan, 2017). Por tratarse de una nueva enfermedad, en Colombia, no se han realizado estudios para investigarla y se desconocen los agentes causales, por lo que el presente estudio se llevó a cabo con el objeto de identificar y caracterizar hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos del ñame.

Materiales y métodos

Para el estudio se seleccionó la zona costanera del departamento de Córdoba, en Colombia, en donde se han presentado los mayores problemas asociados a esta enfermedad y en donde ubican la mayor parte de los agricultores dedicados a esta actividad productiva.

Colecta de tubérculos

Se realizaron colectas de tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), afectados por la pudrición seca de ñame espino. Esta colecta fue manejada bajo los lineamientos señalados en Resolución 1466 del 03 de diciembre de 2014 que expresamente dice: “Por la cual se otorga un permiso marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial y se toman otras determinaciones”. Las colectas se efectuaron en la Subregión zona costanera del departamento de Córdoba, en los municipios de Puerto Escondido, Moñitos y Los Córdoba. La ubicación de los sitios de muestreo se muestra en la Figura 1. En cada localidad se colectaron muestras de diez tubérculos que mostraban síntomas característicos de la pudrición seca, que se encontraban en almacenamiento en sacos y cajas a temperatura ambiente, debido a que los agricultores los

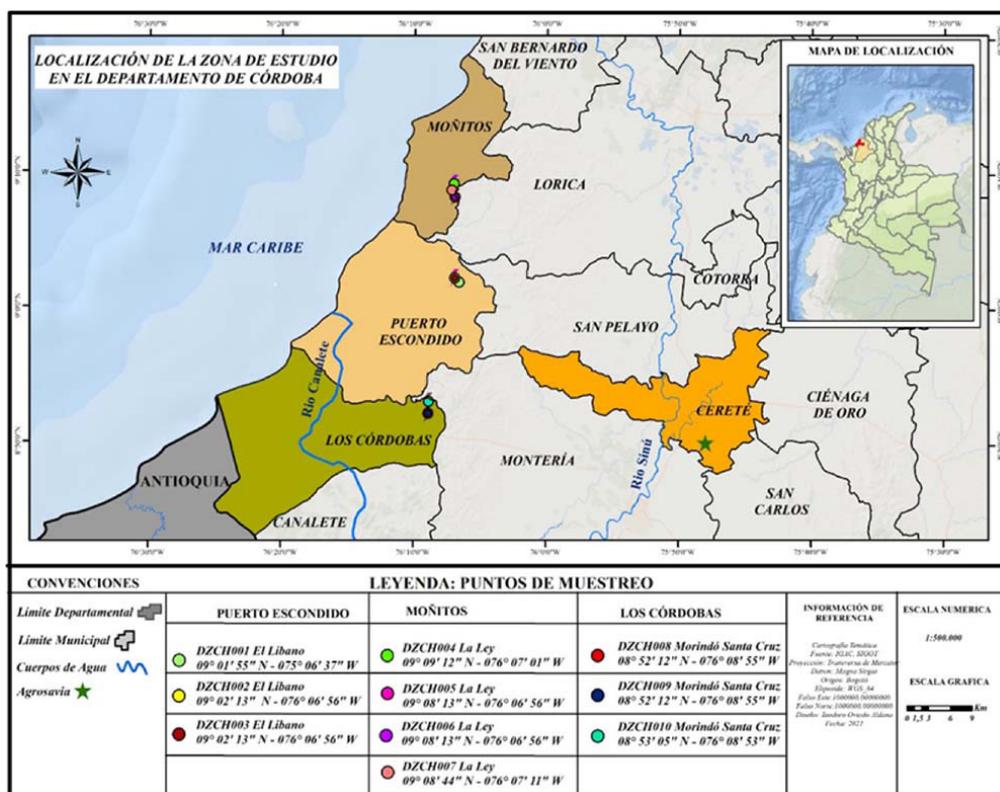


Figura 1. Zonas de muestreo de tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), afectados por pudrición seca en la zona costanera del departamento de Córdoba del Caribe colombiano. 2019.

Figure 1. Sampling areas of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers, affected by dry rot disease in the coastal zone of the department of Córdoba in the colombian Caribbean. 2019.

conservan como semillas para próximas cosechas. Una vez colectados, se depositaron en bolsas plásticas estériles y transportados en neveras a temperatura entre -4 y -8 °C, a los laboratorios 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.

Aislamiento

El aislamiento de los hongos se efectuó en el laboratorio, según el protocolo diseñado por Montiel et al. (2016). Los tubérculos se dividieron en tres secciones (basal, medio y apical), de las cuales se extrajeron, con cuchillo, rodajas de entre 10 y 12 mm de grosor; estas se lavaron con agua del grifo y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 3 % por 2 min. Las rodajas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se escurrieron en papel filtro. Posteriormente, se dividieron en secciones de 1 cm³ y se sumergieron en alcohol al 70 % por 1 min. Se sembraron en cajas de Petri con medio estéril de agar papa dextrosa (APD Merck®) (39 g l⁻¹), suplementado con Amikacina Biclin® (1 ml l⁻¹). Las cajas se incubaron (Mettler®, INE 500 E5120992, Alemania) a 28±2 °C por siete días. Los crecimientos fúngicos se aislaron en medios de cultivo APD mediante resiembras continuas hasta alcanzar cultivos puros (Chowdhury et al., 2019).

Caracterización morfológica

Se realizó una descripción de los aislamientos mediante observaciones micro y macroscópicas de los cultivos puros, se empleó para las observaciones microscópicas el azul de lactofenol en un microscopio binocular (Leica®, DM500, USA) (Fonseca et al., 2019); al microscopio se vieron la producción de esporas, conidios e hifas. Con base en esta caracterización fue posible la identificación del género presuntivo, mediante la comparación con claves descritas en la literatura por Arenas (2014), Barnet & Hunter (1998) y Garzón (2013). Para la caracterización macroscópica, los cultivos puros se monitorearon a los 7, 14 y 21 días después de la siembra, se describió la coloración, la textura, el borde, la superficie y la presencia o ausencia de exudados (Pacasa-Quisbert et al., 2017). La caracterización morfológica permitió la agrupación de los hongos en morfotipos, acorde con la similitud en las características microscópicas y macroscópicas. Para incentivar la esporulación de algunos de los aislados que no esporularon bajo condiciones normales, se elaboró un caldo de maíz (Curvelo & Rojas, 2010) y se inoculó el hongo, dejándolo incubado (Mettler®, INE 500 E5120992, Alemania) por siete días a 28±2 °C.

Porcentaje de ocurrencia

Con los resultados de la clasificación en morfotipos, se calculó el porcentaje de ocurrencia, mediante la ecuación 1 (Gwa & Richard, 2018):

$$\text{Porcentaje de ocurrencia} = \frac{Y}{Z} \times 100 \% \quad (1)$$

Donde:

Y= número de individuos de un mismo morfotipo.

Z= número total de aislados fúngicos.

Caracterización molecular de los aislados

Se realizó una caracterización molecular de los aislados, mediante la amplificación de la región ITS del DNA ribosomal y de los genes β -tubulina 2 y Calmodulina. La extracción del ADN se realizó con base en el protocolo establecido por Voigt et al. (1999), para lo cual los micelios secos de los hongos, se maceraron con nitrógeno líquido. El pulverizado obtenido se suspendió con 700 μ l de buffer de extracción CTAB (NaCl 1.4M, EDTA 25 mM pH 8.0 20 mM, Tris HCl 100 mM pH 8.4, CTAB 2 %) y se agitaron durante 30 s en vortex (Labnet International, Inc. NJ, VX-200, USA). Las muestras se incubaron a 65 °C por 1 h en baño serológico (Memmert, 29 l, Alemania). Se agregó un volumen igual de cloroformo a cada tubo y se agitó en Vortex por 30 s; estos tubos se centrifugaron (Z 326 K, Alemania) a 12 000 s^{-1} durante 15 min. Del centrifugado se recuperó la fase superior en un nuevo tubo y se precipitó el ADN con la adición de un volumen igual de isopropanol frío (-20 °C). La mezcla se centrifugó a 12 000 s^{-1} por 5 min, descartándose el sobrenadante. El pellet se lavó dos veces con 500 μ l de etanol al 70 %, se centrifugó a 12 000 s^{-1} y se descartó el sobrenadante. Después del lavado se secó a temperatura ambiente y, finalmente se suspendió de nuevo en 200 μ l de buffer TE 1X (Tris-Cl 10 mM [pH 8,0] - EDTA 1 mM [pH 8,0]). El ADN obtenido se almacenó a -20 °C.

En el proceso de PCR, para un volumen de 25 μ l, se preparó una mezcla de 0,1-1,0 μ M de cada cebador (Invitrogen™) (Cuadro 1), 10 pg-1 μ g de ADN, 1 μ l de albúmina de suero bovino y 12,5 μ l de Master mix PCR 2X (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) que contiene 0,05 U μ l⁻¹ Taq ADN polimerasa, tampón de reacción, MgCl₂ 4 mM, 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

Cuadro 1. Cebadores utilizados en la amplificación por PCR del ADN de los hongos asociados a la pudrición seca del tubérculo del ñame (*Dioscorea rotundata*), de la zona costanera del departamento Córdoba del Caribe colombiano. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Table 1. Primers used in the PCR amplification of fungi DNA associated with dry rot disease of the yam (*Dioscorea rotundata*) tubers. Coastal zone of the department of Cordoba in the Colombian Caribbean. 2019. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Cebador	Número de cebador	Secuencia	Fuente
ITS- 1F	380009E04	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns (1993)
ITS-4R	380009E09	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
β -tubulina 2: T1-F	380009F09	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell et al. (2000)
β -tubulina 2: T2-R	380009F04	TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG	
Calmodulina CL1-F	380009H09	GAATTCAAGGAGGCCCTTCTC	O'Donnell & Cigelnik (1997)
Calmodulina CL2-R	381636E08	CTTCTGCATCATGAGCTGGAC	

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MiniAmp Plus (Applied Biosystems™, Singapur, Asia). Para la región ITS se realizó la desnaturalización a 94 °C por 4 min, con 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s; la alineación se realizó a 55 °C por 30 s; la elongación a 72 °C por 45 s y la extensión final a 72 °C por 7 min. Las mismas condiciones de PCR con una temperatura de alineación de 59 °C se conservaron β -tubulina-2 y Calmodulina.

Para verificar la calidad de la extracción de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y para los productos PCR al 2 %. El buffer usado para la preparación del gel y la corrida fue buffer TAE1X y se usó una

cámara de electroforesis horizontal Enduro™ VE20 (Labnet international Inc Taiwán, China). La corrida se realizó a 70 V por 15 min para ADN y 30 min para los productos PCR. Como revelador del gel se usó EZ-vision® (Amresco Inc., USA) y como marcador molecular Generuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). La visualización de las bandas en el gel se realizó en un foto documentador de geles Gel Doc XR (BioRad, USA).

Identificación molecular

Los productos del PCR se enviaron al Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación Tibaitatá-Mosquera-Bogotá, para el análisis de secuenciación Sanger en doble sentido, se utilizó el equipo de electroforesis capilar ABI 3500 (Applied Biosystems™, USA). Las secuencias obtenidas se limpiaron y ensamblaron en una secuencia consenso, se empleó el software Bioedit (Versión 7.0.5.3., Carlsbad, USA). Las secuencias consenso se alinearon con secuencias referenciadas de la base de datos del GenBank mediante la herramienta BLASTn. El árbol filogenético se construyó con el software Mega 10 (Versión 10.0.5., State College, USA), se alinearon las secuencias con la herramienta MUSCLE, y se elaboró el árbol filogenético al utilizar el método de máxima verosimilitud, evaluado por medio del método Bootstrap con 1000 variaciones (Sánchez-López & Pérez-Pazos, 2018).

Resultados

Aislamiento

De los tubérculos colectados se logró el aislamiento de veintiocho crecimientos fúngicos asociados a las lesiones de la enfermedad de la pudrición seca. La localidad Moñitos fue en donde se obtuvo la mayor cantidad de aislados con dieciséis hongos, seguido por el municipio de Puerto escondido con siete hongos y Los Córdoba con cinco hongos.

Morfotipos

Según la semejanza encontrada en las tipologías morfológicas de los aislamientos caracterizados, se agruparon en once morfotipos, los cuales se describen en el Cuadro 2. Los morfotipos DZC2-1, DZC5-1, DZC7-1, DZC9-1, DZC10-1 y DZC11-1 presentaron variación y cambios morfológicos importantes durante su proceso de crecimiento, los cuales se registraron y describieron.

A cada morfotipo encontrado en este experimento, se le realizó un registro fotográfico del crecimiento y de las características morfológicas. Las fotografías se tomaron siete días después de inoculación (ddi) y se encuentran en las Figuras 2 y 3. Debido a que presentaron variabilidad en sus caracteres morfológicos durante su crecimiento, a los morfotipos DZC2-1, DZC5-1, DZC7-1, DZC9-1, DZC10-1 y DZC11-1, se les realizó un seguimiento fotográfico a los 7, 14 y 21 ddi. Estos se evidencian en las Figuras 4 y 5.

Ocurrencia

Los resultados mostraron que los morfotipos DZC3-1 y DZC4-1 presentaron los mayores valores de ocurrencia en los tubérculos de ñame afectados por la pudrición seca en la zona costanera del departamento de Córdoba (Figura 6), mientras que los morfotipos DZC2-1, DZC5-1, DZC8-1, DZC9-1, DZC10-1 y DZC11-1 fueron los que presentaron la menor ocurrencia (Figura 6).

Cuadro 2. Características de los morfotipos de hongos asociados a la enfermedad de la pudrición seca de los tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), en la zona costanera del departamento de Córdoba en el Caribe colombiano. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Table 2. Characteristics of fungal morphotypes associated with dry rot disease of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers in the coastal zone of the department of Córdoba in the Colombian Caribbean. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Morfotipos	Características macroscópicas (anverso y reverso)	Características microscópicas
DZC1-1	Colonia gris, con textura lanosa y micelio aéreo. Reverso negro.	Hifas septadas café. No se evidenciaron estructuras reproductivas.
DZC2-1	Colonia blanca con pigmento violeta, textura lanosa y superficie plana. Reverso beige con café.	Hifas septadas, macro y microconidias en forma de media luna con 2 o 3 septos.
DZC3-1	Colonias negras con textura polvosa y superficie plana. Reverso beige.	Conidióforos hialinos, vesícula globosa que contiene conidios globosos y oscuros.
DZC4-1	Colonia blanca con borde café, textura algodonosa y superficie elevada. Reverso beige.	Hifas aseptadas, esporangio en forma de sombrilla y esporangiosporas globosas café.
DZC5-1	Colonia blanca, textura lanosa, superficie plana. Reverso beige.	Hifas septadas, macro y microconidias con forma de media luna aseptadas.
DZC6-1	Colonias verdes, textura polvosa con superficie elevada. Reverso beige.	Conidióforos ramificados, con filídes que sostienen conidias hialinas ovoides.
DZC7-1	Colonia café, textura lanosa seca y superficie plana. Reverso café.	Hifas septadas café, se evidencian artroconidios.
DZC8-1	Colonias verdes, exudado amarillo, textura polvosa y superficies elevadas. Reverso café-amarillo.	Conidióforos ramificados, con conidios hialinos redondos u ovoides.
DZC9-1	Colonia gris, esclerocios en el centro, textura lanosa con superficie plana. Reverso negro.	Hifas septadas café, conidióforos con dos a cuatro conidias poriformes, pardas con tres septos transversales.
DZC10-1	Colonia blanca, con pigmento violeta, textura lanosa y superficie elevada. Reverso café.	Hifas septadas, con macro y microconidias en forma de media luna con 2 o 3 septos.
DZC11-1	Colonia blanca con pigmento verde, textura granulosa y superficie plana. Reverso beige	Hifas septadas, y conidióforos hialinos con conidios globosos y clamidosporas terminales.

El morfotipo DZC1-1 no presentó estructuras de reproducción en medio APD[®], por lo tanto, para inducir la esporulación se cultivó en caldo de maíz, por lo que se observaron conidias en los extremos de los haustorios (Figura 7).

Identificación molecular

Los once morfotipos de hongos amplificados para la región ITS, visualizados en gel de agarosa al 2 %, mostraron una banda entre 600 y 750 pares de base (pb) (Figura 8). En esta investigación se utilizaron los marcadores β -tubulina 2 y Calmodulina para complementar la caracterización molecular de los hongos asociados a pudrición seca de los tubérculos de ñame. De las cepas caracterizadas con la región ITS fue posible amplificar el gen de la β -tubulina 2 en cinco hongos y se visualizan en el gel de agarosa 2 % bandas entre los 500 y 700 pb (Figura 8) y para el gen de la Calmodulina se presentaron bandas superiores a 750 pb para un solo hongo en el gel de agarosa al 2 % (Figura 8).



Figura 2. Fotografía de las cajas de Petri en donde se muestran las características macroscópicas de los morfotipos de hongos asociados con la pudrición seca de los tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), cultivados en medio APD®. A) anverso y B) reverso de las colonias a los siete días de incubación. Zona costanera del departamento de Córdoba en el Caribe colombiano. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Figure 2. Photograph of the Petri dishes showing the macroscopic characteristics of the fungal morphotypes associated with dry rot disease of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers grown in APD® medium. A) Front and B) reverse of the colonies at seven days of incubation. Coastal zone of the department of Cordoba in the colombian Caribbean. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

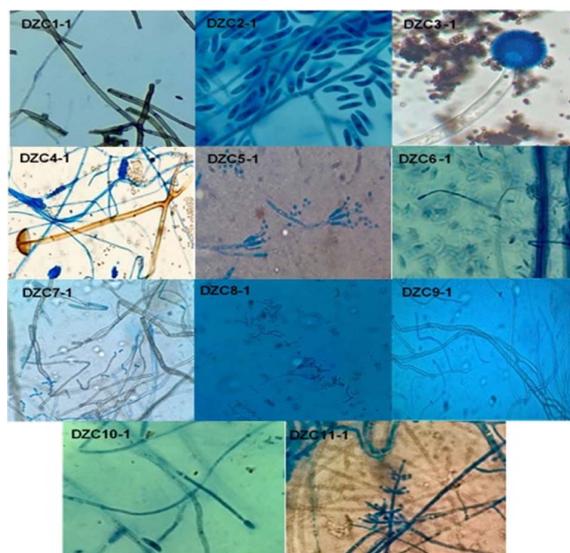


Figura 3. Fotografías de la microscopía (100x) realizada con azul de lactofenol a los once morfotipos de hongos asociados con la pudrición seca de los tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*). Zona costanera del departamento de Córdoba en Colombia. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Figure 3. Photographs of the microscopy (100x) performed with lactophenol blue at eleven fungal morphotypes associated with dry rot disease of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers in the coastal zone of the department of Cordoba in Colombia. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

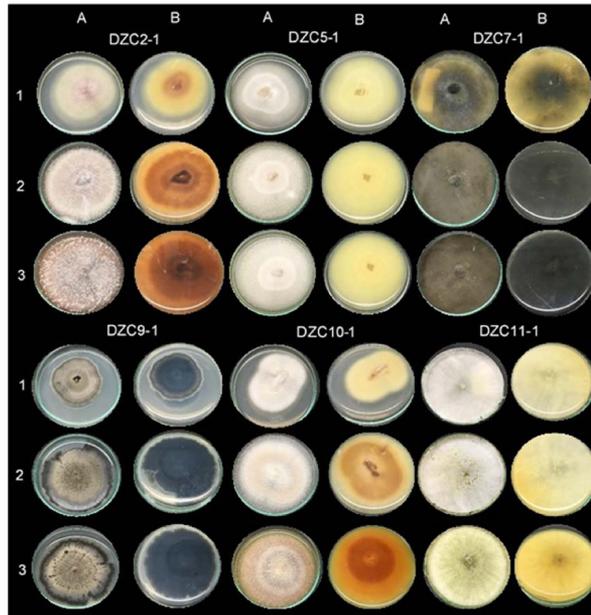


Figura 4. Fotografía de las cajas de Petri de seis de los morfotipos de hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), los cuales muestran cambios morfológicos durante su crecimiento en medio de cultivo APD®. A) Anverso y B) reverso de las colonias. 1) 7 días; 2) 14 días y 3) 21 días. Zona costanera del departamento de Córdoba en el Caribe colombiano. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Figure 4. Photograph of the Petri dishes of six of fungal morphotypes associated with dry rot disease of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers, which show morphological changes during their growth in APD® culture medium. A) Front and B) reverse of the colonies. 1) 7 days; 2) 14 days, and 3) 21 days. Coastal zone of the department of Cordoba in the Colombian Caribbean. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

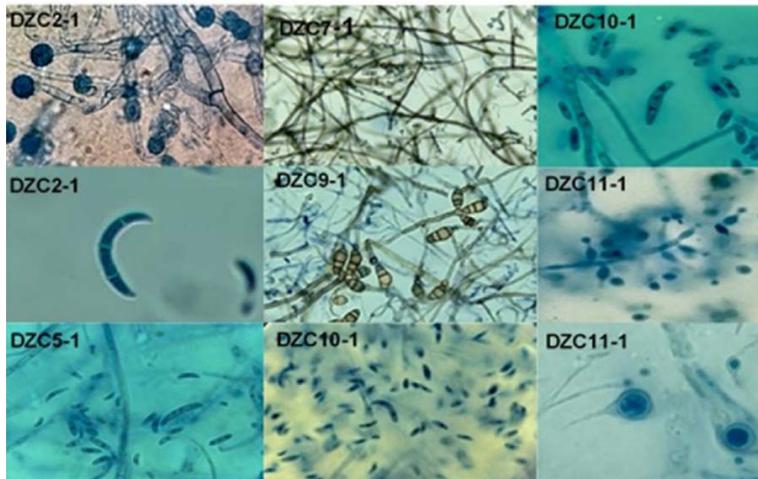


Figura 5. Fotografías de la microscopía (100x) realizada con azul de lactofenol a los seis morfotipos de hongos asociados a la pudrición seca de los tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), a los que se les realizó un seguimiento morfológico. Zona costanera del departamento de Córdoba en Colombia. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Figure 5. Photographs of the microscopy (100x) performed with lactophenol blue to the six fungal morphotypes associated with the dry rot disease of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers that were morphologically monitored. Coastal zone of the department of Cordoba in the Colombian Caribbean. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

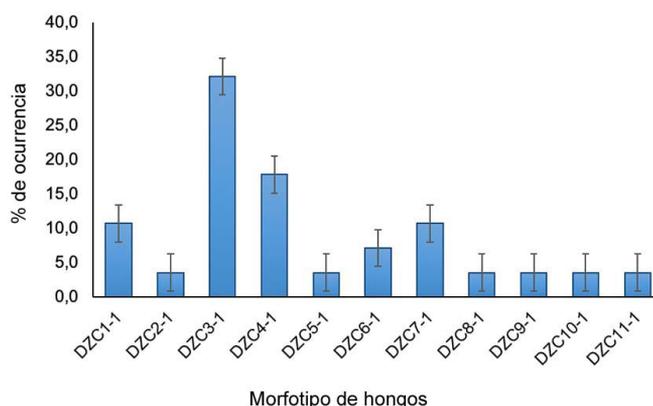


Figura 6. Porcentaje de ocurrencia de los morfotipos de hongos asociados a la pudrición seca de tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), en la zona costanera del departamento de Córdoba en el Caribe colombiano. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Figure 6. Occurrence percentage of fungal morphotypes associated with dry rot disease of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers in the coastal zone of the department of Cordoba in the Colombian Caribbean. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

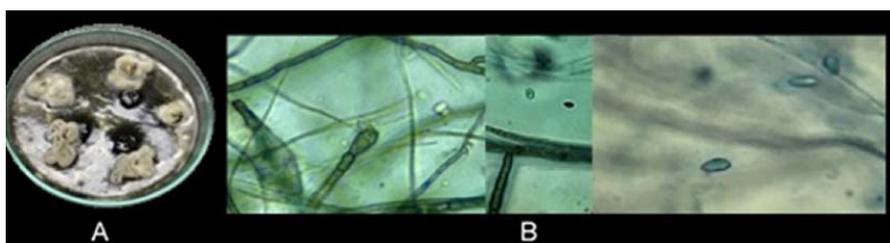


Figura 7. Fotografías de las características morfológicas del morfotipo DZC1-1 en caldo de maíz. A) anverso de la colonia a los siete días y B) microscopía realizada con azul de lactofenol. Zona costanera del departamento de Córdoba en Colombia. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). 2019.

Figure 7. Photographs of the morphological characteristics of the morphotype DZC1-1 in corn broth. A) Front of the colony at 7 days and B) microscopy performed with lactophenol blue. Coastal zone of the department of Cordoba in Colombia. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). 2019.

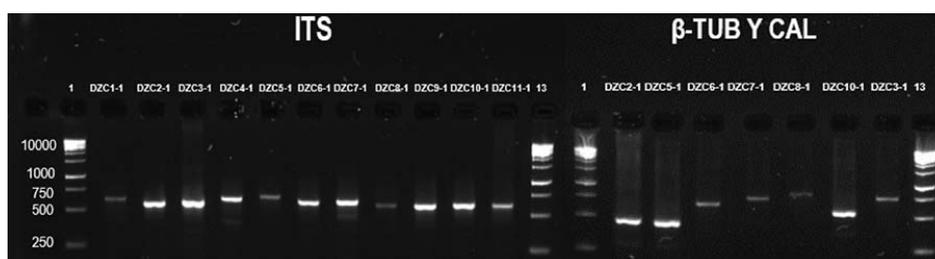


Figura 8. Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos amplificados por PCR de la región ITS y de los genes β -tubulina 2 y Calmodulina, en hongos aislados a partir de la pudrición seca del tubérculo del ñame (*Dioscorea rotundata*). Los carriles 1 y 13 indican el marcador de ADN. Zona costanera del departamento de Córdoba en Colombia. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). 2019.

Figure 8. Analysis of 2 % agarose gel electrophoresis of the products amplified by PCR of the ITS region and of the β -tubulin 2 and Calmodulin genes, in fungi isolated from the dry rot of yam (*Dioscorea rotundata*) tuber. Lanes 1 and 13 indicate the DNA marker. Coastal zone of the department of Cordoba in Colombia. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). 2019.

Las secuencias obtenidas para cada morfotipo comparadas con las secuencias referenciadas obtenidas de la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), tanto para la región ITS, como para los genes β -tubulina 2 y Calmodulina, se lograron identificar diez especies de hongos que se encontraban asociados con las lesiones de la enfermedad de la pudrición seca de los tubérculos de ñame colectados en la zona costanera del departamento de Córdoba en Colombia. A pesar de que inicialmente se habían clasificado como dos morfotipos diferentes, mediante la caracterización molecular se encontró que DZC2-1 y DZC10-1 pertenecen a la misma especie, pero con características macroscópicas diferentes. Todas las secuencias en el ensayo mostraron un porcentaje de similitud superior al 97 % (Cuadro 3).

Cuadro 3. Especies de hongos asociadas a la enfermedad pudrición seca de los tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), en la zona costanera del departamento de Córdoba en Colombia. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). 2019.

Table 3. Fungi species associated with dry rot disease of yam (*Dioscorea rotundata*), tubers in the coastal area of the department of Cordoba in Colombia. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Morfotipo	Especie	% de cobertura	% de similitud	RefSeq	Identificación molecular
DZC1-1	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	92 %	99,81 %	NR_111174.1	ITS
DZC2-1	<i>Fusarium solani</i>	96 %	97,77 %	NR_163531.1	ITS
DZC10-1	<i>Fusarium solani</i>	98 %	98,32 %	MF662660.1	β -tubulina 2
DZC3-1	<i>Aspergillus piperis</i>	93 %	99,83 %	NR_077191.1	ITS
		97 %	97,26 %	JX500075.1	Calmodulina
DZC4-1	<i>Rhizopus oryzae</i>	90 %	97,71 %	NR_103595.1	ITS
DZC5-1	<i>Neocosmospora rubicola</i>	96 %	97,57 %	NR_154227.1	ITS
		98 %	99,25 %	KM232061.1	β -tubulina 2
DZC6-1	<i>Penicillium janthinellum</i>	88 %	98,18 %	NR_111504.1	ITS
		93 %	91,75 %	JQ965069.1	β -tubulina 2
DZC7-1	<i>Neoscytalidium</i> sp.	91 %	98,35 %	MK677466.1	ITS
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	98 %	98,91 %	KF720786.1	β -tubulina 2
DZC8-1	<i>Penicillium citrinum</i>	90 %	99,81 %	NR_121224.1	ITS
		94 %	99,85 %	KU897000.1	β -tubulina 2
DZC9-1	<i>Curvularia aerea</i>	87 %	99,26 %	NR_130689.1	ITS
DZC11-1	<i>Trichoderma lixii</i>	91 %	98,85 %	NR_131264.1	ITS

Por medio del método de análisis estadístico de máxima verosimilitud, se pudo construir un árbol filogenético en el que se observan ramas consistentes y soportadas al emplear el método de Bootstrap, con 1000 repeticiones. En el análisis se involucraron veinticinco secuencias, de las cuales catorce correspondieron a secuencias referenciadas, obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y comparadas con las secuencias de los once morfotipos aislados. En el árbol se pueden observar seis clados distribuidos en dos agrupaciones, la primera y más numerosa, conformada por la división *Ascomycota* y la segunda, menos numerosa, conformada por la división *Zigomicota* (Figura 9).

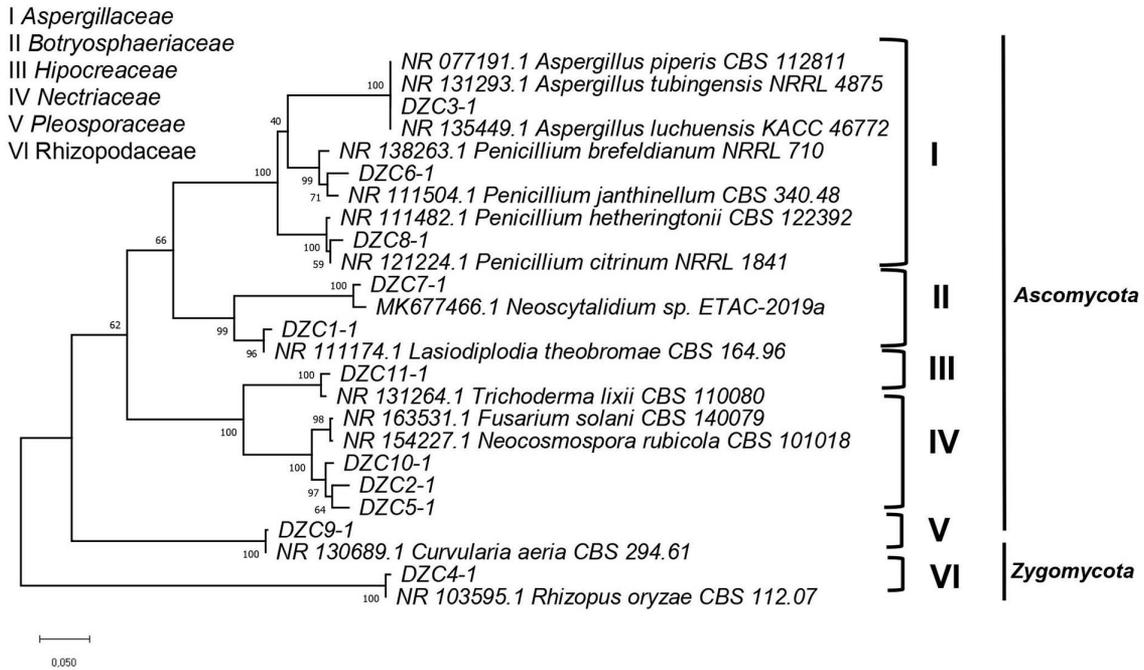


Figura 9. Árbol filogenético de las especies de hongos asociados con la pudrición seca de los tubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata*), según las secuencias del gen ITS analizado por el método de máxima verosimilitud. Zona costanera del departamento de Córdoba del Caribe colombiano. Laboratorio del Centro de Investigación Turipaná de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Figure 9. Phylogenetic tree of fungal species associated with dry rot of yam (*Dioscorea rotundata*) tubers according to the sequences of the ITS gene analyzed by the Maximum likelihood method. Coastal zone of the department of Córdoba of the Colombian Caribbean. Turipana Research Center Laboratory of the Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). Colombia, 2019.

Discusión

En los tubérculos de ñame con síntomas de pudrición seca se aislaron veintiocho crecimientos fúngicos, los cuales se agruparon en once morfotipos. Mediante la amplificación la región ITS del ADN ribosomal y de los genes β -tubulina 2 y Calmodulina, se lograron identificar diez especies de hongos, pertenecientes a nueve géneros fúngicos. Las especies identificadas fueron: *Lasiodiplodia theobromae*, *Aspergillus piperis*, *Fusarium solani*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium janthinellum*, *Neocosmospora rubicola*, *Neoscyladidium dimidiatum*, *Penicillium citrinum*, *Curvularia aeria* y *Trichoderma lixii*. La de mayor ocurrencia en este estudio y posiblemente la más importante relacionada con la pudrición seca de los tubérculos de ñame, es *Rhizopus oryzae* (morfotipo DZC4-1), con un 18 % de ocurrencia en los muestreos realizados en la zona costanera.

Rhizopus oryzae (morfotipo DZC4-1), se reporta en la literatura como patógeno en muchos cultivos, el cual produce enzimas hidrolíticas como amilasas, lipasas, celulasas, proteasas y tannasas (Londoño-Hernández et al., 2017), las cuales tienen gran capacidad enzimática para degradar las paredes celulares de sus hospederos. De igual forma, *R. oryzae* se ha asociado con la separación celular y maceración de tejido de la papa en almacenamiento (*Solanum tuberosum*) (Amadioha, 2001). Se encuentran reportes de su aislamiento en una gran variedad de suelos, vegetales, frutas y semillas en descomposición (Londoño-Hernández et al., 2017). Este hongo se caracteriza por su

rápido crecimiento, se le conoce como colonizador primario o secundario e invasión de sustratos ricos en azúcares simples (Battaglia et al., 2011).

La especie de hongo *Neoscytalidium dimidiatum* (Morfotipo DZC7-1), fue encontrada en este estudio con un porcentaje de ocurrencia 10,7 %. En la literatura, se reporta que “este hongo está afectando raíces tuberosas de batata, las cuales mostraban machas oscuras en la superficie, extendiéndose hacia el centro, lo que causó una necrosis interna de color marrón a negro” (Mello et al., 2019). De igual forma, se reporta en otra investigación que está asociado a la pudrición de hojas y tallos en plantas de *D. esculenta*, donde se aisló e identificó a nivel molecular con el gen β -tubulina 2 (BT2) y el factor de elongación 1-alfa (TEF 1- α), como el hongo *N. dimidiatum* (Lin et al., 2017).

En este estudio *Fusarium solani*, correspondiente a los morfotipos DZC2-1 y DZC10-1, presentó un porcentaje de ocurrencia del 7,2 %. Este hongo es un fitopatógeno causante de la pudrición del tubérculo de *D. rotundata* (Ajayi & Olorundare, 2014; Gwa & Ekefan, 2018; Rosado, 2016). *F. solani* hace parte de un complejo que comprende aproximadamente 60 especies ampliamente reconocidas como fitopatógenos (Coleman, 2016). Este tipo de hongo posee capacidad de infección, con esporas y metabolitos tóxicos, en los cuales se destacan la fitotoxinas y micotoxinas, lo que confirma su patogenicidad (Villa-Martínez et al., 2015). La especie *F. solani* detallada en este estudio coincide con varios autores (Chinchilla, 2017; Hernández-Trejo et al., 2019), al presentar una coloración blanca, que cambia a rosa o violeta con el avance de su crecimiento. Esta pigmentación se relaciona con la esporulación del hongo, lo que coincide con lo reportado por Osorio-Gutiérrez & Castaño-Zapata (2011).

Otro de los hongos encontrado asociado a la pudrición seca de los tubérculos de ñame fue *Neocosmospora rubicola* o Morfotipo DZC5-1 en estos estudios. Este hongo ha sido reportado como endófito en raíces de *Glycyrrhiza uralensis* (Kim et al., 2017) y a su vez, reportado por Zheng et al. (2018) como el causante de la pudrición del tallo de la pitaya. Sobre este hongo, actualmente, existe una discusión entre algunos autores, que involucran al género *Neocosmospora* con el género *Fusarium*, debido a la similitud en cuanto a sus características macroscópicas y microscópicas. Lombard et al. (2015), analizaron filogenéticamente algunas especies del género *Neocosmospora* y debido a ello, este género fue ubicado en el clado IX de la familia Nectriaceae, separándolo de esta forma del complejo *F. solani*, algunos autores no aceptan esta idea, como Sandoval-Denis y Crous (2019), quienes argumentan que aún faltan análisis tanto morfológicos como filogenéticos que ayuden a determinar si el género *Neocosmospora* hace parte o no del complejo de *F. solani*. Cabe mencionar, que los resultados morfológicos expuestos en este estudio dificultan la diferenciación entre estas especies, debido a la similaridad en sus características tanto microscópicas como macroscópicas, con un porcentaje de ocurrencia 3,6 %.

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* o morfotipo DZC1-1 presentó en este estudio un porcentaje de ocurrencia 3,6 %; este hongo ha sido asociado por muchos investigadores como un hongo de alta virulencia y patogenicidad sobre los tubérculos de varias especies (Ali et al., 2020; Gwa & Ekefan, 2017). “Los tubérculos afectados por *L. theobromae*, muestran podredumbre seca, con tejidos de coloración negra y aspecto pulverulento” (Dania et al., 2019). *L. theobromae* no solo se ha obtenido en enfermedades en los tubérculos, sino que ha estado relacionado también con la pudrición de frutas (Peixinho et al., 2019). En este estudio al inocular el caldo de maíz se presentaron estructuras con características fitopatógenicas de esta especie, las cuales están relacionadas con procesos parasitarios de este tipo de hongos en plantas de interés económico (Salcedo-Morales et al., 2017). El género *Lasiodiplodia*, necesita de ambientes específicos para su crecimiento (Munirah et al., 2017), por lo siguiente, en este estudio no esporuló en el medio de cultivo APD®.

La especie *Curvularia aeria* o morfotipo DZC9-1, presentó un porcentaje de ocurrencia en este estudio del 3,6 %. Del género *Curvularia* se aislaron e identificaron algunas especies como causantes de la pudrición de tubérculos de ñame en almacenamiento (Gwa & Richard, 2018). El género *Curvularia* ha sido reportado en enfermedades foliares, en plantas de categoría económica como maíz (Rojas et al., 2019), el arroz (De-Pinho et al., 2019), y el tomate (Nayab & Akhtar, 2016).

De las diez especies de hongos encontradas en estos ensayos, cuatro de ellas podrían descartarse como agentes causales de la pudrición seca de los tubérculos de ñame, debido a que en la literatura se reportan tres de ellas como agente benéfico de biocontrol, y una como agente secundario o saprófito. En el primer caso, las especies *Aspergillus piperis*, *Penicillium citrinum* y *Trichoderma lixii* se reportan en la literatura como especies de hongos que actúan como agentes de biocontrol. *Aspergillus piperis* que presentó la mayor ocurrencia en este estudio (32 %) es reportado por Jovičić-Petrović et al. (2016) como “antagonista contra patógenos, cuya acción se realiza mediante la secreción de un complejo de metabolitos como el ácido glucónico, ácido cítrico y derivados del ácido itacónico”.

Penicillium citrinum ha sido reportado en girasol (*Helianthus annuus*) como un hongo endófito, que protege al cultivo de enfermedades. Este hongo produce metabolitos activos con potencial antifúngico, insecticida y antimicrobiano (Waqas et al., 2015) y como controlador biológico, debido a la producción de janthinell, una toxina que ataca patógenos responsables de la pudrición de la raíz y de la podredumbre del sorgo (*Sorghum bicolor*) (Sreevidya & Gopalakrishnan, 2016). *Trichoderma lixii*, aunque ha sido aislado de tubérculos de ñame en etapa de podredumbre (Ezeibekwe et al., 2016), es un género de hongo reportado en la literatura como un agente antagonico, benéfico o biocontrolador (Montiel et al., 2016). Aunque se desconoce la rutina de utilizar biocontroladores por parte de los agricultores de ñame en la zona bajo estudio, es de resaltar que *Trichoderma* es un género fúngico habitante natural de los suelos, por lo que se cree que este hongo está relacionado con acciones benéficas de control en los cultivos de ñame. Este hongo presentó una ocurrencia de tan solo el 3,6 % en el presente estudio.

El hongo *Penicillium janthinellum* con una ocurrencia del 7,1 %, ha sido reportado como un hongo saprófito que puede estar asociado en forma secundaria con los tubérculos de ñame (Montiel et al., 2016).

Conclusiones

De los tubérculos de ñame afectados por la pudrición seca, se lograron aislar veintiocho crecimientos fúngicos, los cuales, por sus características macro y microscópicas fueron agrupados en once morfotipos.

Mediante el uso de herramientas moleculares se lograron identificar diez especies, de las cuales se asociaron seis con la enfermedad seca de los tubérculos del ñame en la zona costanera del departamento de Córdoba en Colombia.

Las posibles especies relacionadas con la pudrición seca serían: *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*, *Rhizopus oryzae*, *Neocosmospora rubicola*, *Neoscytalidium dimidiatum* y *Curvularia aerea*.

Con base en los resultados obtenidos la investigación que continua, es la de realizar pruebas de patogenicidad en tubérculos de ñame, a fin de comprobar su asociación con la enfermedad de la pudrición seca en la zona costanera de Córdoba en el Caribe colombiano y determinar el mejor tratamiento para su control. Se debe realizar también un muestreo al resto del área sembrada de ñame en la región Caribe de Colombia, a fin de corroborar la asociación de estos y otros hongos con la enfermedad.

Agradecimientos

Se agradece al Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Turipaná y a la Universidad de Córdoba.

Referencias

- 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 Journal Annals of Science*, 8(1), 70–74. <https://doi.org/10.21467/ias.8.1.70-74>.
- Ajayi, A. O., & Olorundare, S. D. (2014). Bacterial and fungal species associated with yam (*Dioscorea rotundata*) rot at Akungba-Akoko, Ondo State of Nigeria. *Applied Science Research Journal*, 2(2), 12–28. https://www.researchgate.net/publication/329254575_BACTERIAL_AND_FUNGAL_SPECIES_ASSOCIATED_WITH_YAM_DIOSCOREA_ROTUNDATA_ROT_AT_AKUNGBA-AKOKO_ONDO_STATE_OF_NIGERIA
- Ali, S. S., Asman, A., Shao, J., Balidion, J. F., Strem, M. D., Puig, A. S., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. (2020). Genome and transcriptome analysis of the latent pathogen *Lasiodiplodia theobromae*, an emerging threat to the cacao industry. *Genome*, 63(1), 37–52. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0112>
- Amadioha, A. C. (2001). Fungitoxic effects of some leaf extracts against *Rhizopus oryzae* causing tuber rot of potato. *Archive of Phytopathology and Plant Protection*, 33(6), 499–507. <https://doi.org/10.1080/03235400109383372>
- Arenas, R. (2014). *Micología médica ilustrada*. Mc Graw Hill.
- Arya, R. S., Sheela, M. N., Jeeva, M. L., & Abhilash, P. V. (2019). Identification of Host Plant Resistance to Anthracnose in Greater Yam (*Dioscorea alata* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(8), 1690–1696. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.808.199>
- Barnet, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi 4 th*. The American Phytopathological Society Press.
- Battaglia, E., Benoit, I., Van den Brink, J., Wiebenga, A., Coutinho, P.M., Henrissat, B., & de Vries, R. P. (2011). Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. *BMC Genomics*, 12(1), Article 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-38>
- Chinchilla, S. G. (2017). *Identificación molecular y morfológica de las especies de Fusarium, asociadas al cultivo de la pimienta negra (Piper nigrum L.) en la virgen de Zarapiqué* (Tesis Doctoral, no publicada). Universidad de Costa Rica.
- Chowdhury, M. K., Jahan, M. S., Akhtar, S., Islam, M. A., Islam, M. A., Sikdar, B., & Hasan, M. F. (2019). Characterization of fungal pathogens causing diseases in bitter melon and establishment of their eco-friendly control measure. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 6(1), 109–115. https://www.researchgate.net/profile/Md_Hasan151/publication/330423175_Characterization_of_fungal_pathogens_causing_diseases_in_bitter_melon_and_establishment_of_their_eco-friendly_control_measure/links/5c49434d299bf12be3df2643/Characterization-of-fungal-pathogens-causing-diseases-in-bitter-melon-and-establishment-of-their-eco-friendly-control-measure.pdf
- Coleman, J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Coursey, D. G. (1967). *Yam: An account of the nature, origins, cultivation and utilization of the useful member of the Dioscoreaceae*. Longmans, Green and Co. Ltd.
- Curvelo, G. L., & Rojas, B. A. J. (2010). *Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylum Ascomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas* (Tesis de Pregrado, no publicada). Pontificia Universidad Javeriana.

- 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*, 66(3), 1–10. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1629041>
- De-Pinho, R. S. C., Pozzebon, B. C., Calvano, C. C. A., Vey, R. T., dos Santos Hajar, A., Rodrigues, B. M., & Rodrigues, K. R. R. (2019). Bioprospección de rizobacterias para el control *in vitro* de *Pyricularia grisea*, tratamiento de semillas y promoción de crecimiento de plántulas de arroz. *Biotemas*, 32(3), 23–34. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2019v32n3p23>
- Ezeibekwe, I.O., Umeoka, N., & Izuka, C.M. (2016). Field survey of symptoms and isolation of fungi associated with post-harvest rots of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Journal of Food Processing & Technology*, 7(12), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000642>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). *Statistical databases*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Fonseca, J. Y., Castañeda, A. E., Escarraga, J. O., & Cubillos, D. D. (2019). Caracterización de enfermedades fitopatógenas en el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en la finca el reposo en el municipio Facativá, Cundinamarca. *Ciencias Agropecuarias*, 5(1), 24–31. <https://doi.org/10.36436/24223484.192>
- 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>
- Garzón, N. (2013). *Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guazca y Cruz verde, Cundinamarca-Colombia* (Tesis de Pregrado, no publicada). Pontificia Universidad Javeriana.
- 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. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 10(3), Article 555787. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.10.555787>
- Gwa, V. I., & Ekefan, E. J. (2018). Fungicidal effect of some plant extracts against tuber dry rot of white yam (*Dioscorea rotundata*) Caused by *Aspergillus Niger*. *International Journal of Horticulture & Agriculture*, 3(3), Article 123. https://www.researchgate.net/publication/330365381_Fungicidal_Effect_of_Some_Plant_Extracts_against_Tuber_Dry_Rot_of_White_Yam_Dioscorea_Rotundata_Poir_Caused_by_AspERGILLUS_niger
- Gwa, V. I., & Richard, I. B. (2018). Susceptibility of white yam (*Dioscorea rotundata*) tuber to rot fungi and control with extracts of *Zingiber officinale* Rosc. *Azadirachta indica* A. Juss. and *Piper guineense* Schumach. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 9(9), Article 452. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000452>
- Hernández-Trejo, A., Estrada-Drouaillet, B., López-Santillán, J. A., Rios-Velasco, C., Varela-Fuentes, S. A., Rodríguez-Herrera, R., & Osario-Hernández, E. (2019). *In vitro* evaluation of native entomopathogenic fungi and neem (*Azadirachta indica*) extracts on *Spodoptera frugiperda*. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 88(1), 47–54. <http://doi.org/10.32604/phyton.2019.04611>
- Jovičić-Petrović, J., Jeremić, S., Vučković, I. M., Vojnović, S., Bulajic, A., Raicevic, V., & Nikodinović-Runić, J. (2016). *Aspergillus piperis* A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen *Pythium aphanidermatum*. *Archives of Biological Sciences*, 68(2), 279–289. <https://doi.org/10.2298/ABS150602016J>

- Kim, J. H., Kim, D.Y., Park, H., Cho, J. H., & Eom, A. H. (2017). *Neocosmospora rubicola*, an unrecorded endophytic fungus isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis* in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 45(1), 63-67. <https://doi.org/10.4489/KJM.20170007>
- 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), Article 1320. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0167-PDN>
- Lombard, L., Van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, 80, 189–245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>
- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H. A., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar-Gonzalez, M. A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2017). *Rhizopus oryzae*—Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 110–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.012>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018). *Indicadores e instrumentos del sector productivo del ñame en Colombia*. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Yuca/Documentos/2018-09-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Mello, J. F., Brito, A. C. Q., Motta, C. M. S., Vieira, J. C. B., Michereff, S. J., & Machado, A. R. (2019). First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing root rot in sweet potato in Brazil. *Plant Disease*, 103(2), Article 373. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1242-PDN>
- Montiel, M. F., Isla, L. H., & Romero, L. M. (2016). Microorganismos fitopatógenos y asociados a tubérculos de cultivares de ñame (*Dioscorea* sp.). *Agricultura Tropical*, 2(1), 61–68. http://ojs.inivivt.cu/index.php?journal=inivivt&page=article&op=view&path%5B%5D=46&path%5B%5D=AT02012016_7MP-011.pdf
- Munirah, M. S., Azmi, A. R., Yong, S. Y. C., & Nur Ain Izzati, M. Z. (2017). Characterization of *Lasiodiplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae* causing fruit rot on pre-harvest mango in Malaysia. *Plant Pathology & Quarantine*, 7(2), 202–213. <https://doi.org/10.5943/ppq/7/2/14>
- Nayab, M., & Akhtar, N. (2016). New report of *Cycas revoluta* leaf necrosis by *Phoma herbarum* from Pakistan. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(4), 193–196. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0026-z>
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the Fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103–116. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- 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>
- Osorio-Gutiérrez, L. A., & Castaño-Zapata, M. (2011). Caracterización del agente causante de la pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* linneo), enfermedad endémica en el municipio de Manizales Caldas (Colombia). *Agronomía*, 19(2), 33–43. [http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia19\(2\)_4.pdf](http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia19(2)_4.pdf)
- 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. http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v8n1/v8n1_a02.pdf

- Peixinho, G. D. S., Ribeiro, V. G., Amorim, E. P. D. R., & Morais, A. C. D. M. (2019). Ação do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon nardus* L) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. *Summa Phytopathologica*, 45(4), 428–431.
- Purseglove, J. W. (1972). *Tropical crops-monocotyledons London*. Longmans Green and Co. Ltd.
- Rojas, L., Cajiao, A., & Rivera, K. (2019). Estudio y análisis presuntivo de la fertilidad microbiana del suelo de un cultivo de maíz (*Zea mays*) en Pamplona, Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 16(1), 3–12. http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/BISTUA/article/view/3186/1697
- Rosado, I. Y. (2016). *Evaluación de fungicidas orgánicos y convencionales para el control de enfermedades foliares en ñame (Dioscorea alata L.)* (Tesis Maestría, no publicada). Universidad de Puerto Rico.
- Salcedo-Morales, G., Trejo-Espino, J. L., Martínez-Bonfil, B. P., Cruz-Sosa, F., & Trejo-Tapia, G. (2017). Formación de raíces e inducción de haustorios de *Castilleja tenuiflora* Benth. con catequina y peróxido de hidrógeno. *Polibotánica*, 44, 147–157. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.44.11>
- Sánchez-López, D. B., & Pérez-Pazos, J. V. (2018). Caracterización y evaluación de PGPRs sobre el crecimiento de plántulas de *Dioscorea rotundata* in vitro. *Agronomía Costarricense*, 42(2), 75–91. <https://doi.org/10.15517/rac.v42i2.33780>
- Sandoval-Denis, M., & Crous, P. W. (2018). Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora*. *Persoonia*, 41, 109–129. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.06>
- Sreevidya, M., & Gopalakrishnan, S. (2016). *Penicillium citrinum* VFI-51 as biocontrol agent to control charcoal rot of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.). *African Journal of Microbiology Research*, 10(19), 669–674. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7831>
- Shiriki, D., Ubwa, S. T., y Shambe, T. (2015). Isolation of nine microorganisms from rotten *Dioscorea rotundata* (white yam) and antimicrobial sensitivity test with five plant extracts. *Food and Nutrition Sciences*, 6(10), 825–835. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.610086>
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* sp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Voigt, K., Cigelnik, E., & O'donnell, K. (1999). Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 3957–3964. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.3957-3964.1999>
- Waqas, M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shahzad, R., Kang, S. M., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2015). Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: An example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *Journal of plant interactions*, 10(1), 280–287. <https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1079743>
- Zheng, F., Xu, G., Zheng, F. Q., Ding, X. F., & Xie, C. P. (2018). *Neocosmospora rubicola* causing stem rot of Pitaya (*Hylocereus costaricensis*) in China. *Plant Disease*, 102(12), 2653–2653. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1469-PDN>