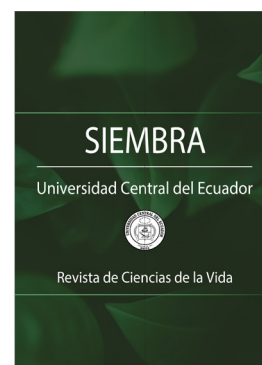


Aislamiento y patogenicidad de agentes asociados al mal seco en quequisque (*Xanthosoma violaceum* L. Schott), en Nicaragua

Isolation and pathogenicity of associated agents to root rot disease in cocoyam (*Xanthosoma violaceum* L. Schott) in Nicaragua

Heeidy Guadalupe Corea Narváez¹, Rayan Oniel Gonzalez Moya²,
Guillermo del Carmen Reyes Castro³



Siembra 11 (2) (2024): e6796

Recibido: 10/06/2024 / Revisado: 26/09/2024 / Aceptado: 24/10/2024

¹ Universidad Nacional Agraria. Dirección de Ciencias Agrarias. Kilómetro 12.5 carretera Norte. Código postal: 453. Managua, Nicaragua.

✉ hcorea@ci.una.edu.ni

🌐 <https://orcid.org/0000-0002-1095-8218>

² Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. Frente a la delegación V de la Policía Nacional. Código postal: 1247. Managua, Nicaragua.

✉ rayangonzalez91@gmail.com

🌐 <https://orcid.org/0000-0002-8994-9890>

³ Universidad Nacional Agraria. Dirección de Ciencias Agrarias. Kilómetro 12.5 carretera Norte. Código postal: 453. Managua, Nicaragua.

✉ greyes@ci.una.edu.ni

🌐 <https://orcid.org/0000-0003-0164-437X>

*Autor de correspondencia:

hcorea@ci.una.edu.ni

Resumen

El mal seco es la enfermedad más destructiva del quequisque (*Xanthosoma violaceum*). El aislamiento de *Pythium myriotylum* requiere de muestras de raíces frescas; por lo que se deben desarrollar técnicas de aislamiento específicas y medios selectivos. En este estudio, se evaluaron técnicas para el aislamiento de *Pythium myriotylum* y se determinó la patogenicidad de microorganismos asociados a mal seco en quequisque. Se evaluaron tres métodos de aislamiento: a) diluciones de suelo, b) raíces con síntomas de mal seco, y c) hojas de quequisque como cebos [HQC]. Se colocaron los aislados en diferentes medios de cultivo a) papa dextrosa agar, b) agar agua + sulfato de estreptomycin, c) V8 + Pimaricina, Ampicilina, Rifampicina y Benomil [PARB]; y d) el medio cloruro de tetrazolio, para bacterias. Se utilizaron claves taxonómicas para la identificación de los microorganismos aislados. La patogenicidad se evaluó en invernadero con vitroplantas de quequisque Lila al inocular los aislados obtenidos, solos y su combinación, al sustrato estéril y un tratamiento testigo sin inoculación. Agentes patógenos como *P. myriotylum*, *F. solani* y *R. solanacearum*, fueron aislados. *Pythium* spp. tuvo un crecimiento micelial con estructuras fructíferas abundantes con el método HQC en V8-PARB. En la prueba de patogenicidad, los tratamientos combinados con *P. myriotylum* mostraron síntomas de afectación en las raíces. El método de aislamiento de *Pythium myriotylum* a partir de suelo, con hojas de quequisque y combinado con el medio de cultivo V8-PARB fue el más efectivo, obteniéndose aislados con micelio abundante que facilitaron su identificación morfológica. *P. myriotylum* provocó síntomas característicos de mal seco en las vitroplantas de quequisque lila. Las plantas inoculadas con *F. solani* y *R. solanacearum*, solos o combinados, no presentaron síntomas de mal seco.

Palabras clave: *Pythium myriotylum*, capacidad infectiva, agentes infecciosos, prueba de patogenicidad.

Abstract

Dry rot represents the most destructive disease of cocoyam (*Xanthosoma violaceum*). The isolation of *Pythium myriotylum* requires the use of fresh root samples, so specific isolation techniques and selective growth

SIEMBRA

<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/SIEMBRA>

ISSN-e: 2477-8850

Periodicidad: semestral

vol. 11, núm 2, 2024

siembra.fag@uce.edu.ec

DOI: <https://doi.org/10.29166/siembra.v11i2.6796>



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución-NoComercial

media must be developed. The objective of this study was to evaluate techniques for the isolation of *Pythium myriotylum* and to determine the pathogenicity of microorganisms associated with dry rot in cocoyam. The efficacy of three isolation methods was assessed: a) soil dilutions, b) roots exhibiting symptoms of dry rot, and c) cocoyam leaves as baits [HQC]. The isolates were placed in different culture media, namely a) potato dextrose agar, b) water agar + streptomycin sulfate, c) V8 + Pimaricin, Ampicillin, Rifampicin and Benomyl [PARB]; and d) tetrazolium chloride medium, for bacteria. The isolated microorganisms were identified using taxonomic keys. The pathogenicity of the isolates was evaluated in a greenhouse setting using with vitroplants of cocoyam Lila. This was done by inoculating the isolates obtained, alone and in combination, to a sterile substrate and a control treatment without inoculation. The *Pythium* spp. demonstrated mycelial growth with an abundance of fruiting structures when the HQC method and V8-PARB culture media were employed. The pathogenicity test revealed that the combined treatments with *P. myriotylum* resulted in the manifestation of symptoms indicative of root damage. The combination of soil isolation with cocoyam leaves, and the V8-PARB culture media was the most effective method for the isolation of *Pythium myriotylum*. This approach resulted in the growth of abundant mycelium that facilitated morphometric identification. *P. myriotylum* was observed to induce symptoms consistent with dry rot in vitroplants of cocoyam. Inoculation of plants with *F. solani* and *R. solanacearum*, either individually or in combination, did not result in the manifestation of symptoms characteristic of dry rot.

Keywords: *Pythium myriotylum*, infectious capacity, infective agents, pathogenicity test.

1. Introducción

El mal seco es la enfermedad más destructiva del quequisque (*Xanthosoma* spp.) a escala mundial (Saborío et al., 2004), puede causar pérdidas de 70-80 % del rendimiento (Folgueras Montiel et al., 2015) o totales (Acebedo Rivera y Navarro Matute, 2010; Saborío et al., 2004). Los síntomas son crecimiento lento, clorosis y necrosis de las hojas más viejas, las hojas jóvenes presentan color verde pálido y en casos severos las hojas se doblan en forma de arco y hay reducción o eliminación del sistema radicular (Reyes Castro, 2006; Reyes Castro et al., 2013). El patógeno persiste en el suelo por muchos años y una vez que los suelos están infestados no pueden ser cultivados de nuevo, por la sobrevivencia del agente causal en el suelo (Saborío et al., 2004).

En Nicaragua, el mal seco está presente en las zonas de producción para exportación (Nueva Guinea, El Rama, Río San Juan) y en zonas no tradicionales de la Región Central en la frontera agrícola del trópico húmedo, donde se obtienen buenos rendimientos por no más de dos ciclos seguidos; por lo que los agricultores abandonan el área para continuar la producción en suelos libres de la enfermedad, lo que encarece la producción y contamina los suelos libres del patógeno (Saavedra y Reyes, 2012).

Diferentes patógenos se han reportado asociados al mal seco: *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Erwinia* y *Pseudomonas* (Giacometti y León, 1994), *Sclerotium rolfsii* (Bejarano-Mendoza et al., 1998); *Fusarium* spp. (Saborío et al., 2004) y un complejo de hongos en Cuba (Folgueras Montiel et al., 2015). Otros estudios reportan *Pythium myriotylum* Dreschler como único agente causal de la enfermedad (Nzietchueng, 1984; Pacumbaba et al., 1992; Perneel et al., 2006, Tambong et al., 1999).

En Nicaragua se aisló *P. myriotylum* de cortes de raíces que presentaban síntomas recientes de la enfermedad, en el medio de cultivo agar con harina de maíz más los antibióticos pimaricina, ampicilina y rifampicina (Rodríguez Zamora y Ramírez Reynosa, 2012). Otros autores aislaron el patógeno de raíces que presentaban secciones manchadas o necróticas en medio de cultivo agar agua más antibiótico (estreptomomicina) (Olorunleke et al., 2014; Perneel et al., 2006; Tambong et al., 1999).

La metodología utilizada en Nicaragua, en el aislamiento de *P. myriotylum*, requiere de muestras de tejido fresco con lesiones recientes. Los laboratorios de fitopatología se encuentran ubicados a más de 250 km de las zonas productoras de quequisque, por lo que se dificulta la obtención de muestras de raíces frescas y se utiliza el medio PDA sin antibióticos, lo que provoca el crecimiento de diferentes hongos que pueden inhibir el crecimiento de *P. myriotylum*, dificultando de esta forma la obtención de un aislado puro para realizar pruebas de patogenicidad y otros estudios. Esto conlleva buscar métodos más prácticos y medios de cultivos selectivos en la captura de *P. myriotylum*, a partir de suelo infestado, sin necesidad de que la planta esté viva. Ciertos estudios reportan la utilización de cebos de diferentes partes de plantas en la captura de oomicetes a partir de suelo con cebos de pétalos de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) y cebos de frutos de chiltoma (*Capsicum annum* L.) (Sinobas et al., 1999; Urrutia-Anaya y Pacheco-Aguilar, 2009).

Este estudio tuvo el fin de evaluar métodos de aislamiento de *Pythium myriotylum* en quequisque lila (*Xanthosoma violaceum*) y otros microorganismos asociados al mal seco y realizar una prueba de patogenicidad para verificar al agente causal de la enfermedad.

2. Materiales y Métodos

2.1. Recolección de muestras

Se recolectaron cinco plantas de quequisque de cuatro meses con síntomas de la enfermedad mal seco (plantas con clorosis y necrosis en las hojas más viejas) y 2 kg de suelo circundante por punto de muestreo (dos puntos), de una plantación comercial de quequisque con antecedentes de mal seco en Nueva Guinea, Región Autónoma Costa Caribe Sur, Nicaragua (11°42'39.3" N 84°26'46.2" O). Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Micología de la Universidad Nacional Agraria [UNA] en Nicaragua. Se aislaron los patógenos relacionados con el mal seco y se registraron las características morfométricas de los hongos y las bacterias.

2.2. Aislamientos de patógenos asociados al mal seco

Para el aislamiento de los patógenos asociados con el mal seco se utilizaron tres métodos en tres medios de cultivos (Tabla 1). Se emplearon 10 platos Petri para cada método y medio de cultivo.

Tabla 1. Composición de medios de cultivo utilizados en el aislamiento de patógenos asociados al mal seco de quequisque a partir de diluciones seriadas, raíces con síntomas y hojas de quequisque como cebo.

Table 1. Composition of culture media used in the isolation of pathogens associated with dry rot disease in cocoyam from soil serial dilutions, roots exhibiting symptoms of dry rot, and cocoyam leaves as bait.

Medio de cultivo	Ingredientes	Concentración	Antibióticos	Concentración	Fuente
PDA ¹	Papa agar dextrosa	39 g L ⁻¹	---	---	Cañedo y Ames (2004)
AA+SE ²	Agar	15 g L ⁻¹	Sulfato de estreptomomicina	400 mg L ⁻¹	Nyochembeng et al. (2002); Olunleke et al. (2014); Perneel et al. (2006); Tambong et al. (1999)
V8-PARB ³	Jugo V8	100 mL L ⁻¹	Pimaricina	400 µL L ⁻¹	Gómez-Alpizar et al. (2011); Rodríguez Zamora y Ramírez Reynoza (2012); Steiner (1981)
	H ₂ O	900 mL L ⁻¹	Ampicilina	250 mg L ⁻¹	
	CaCO ₃	1,75 g L ⁻¹	Rifampicina	20 mg L ⁻¹	
	Betasitosterol	0,05 g L ⁻¹	Benomil	20 mg L ⁻¹	

¹ PDA: papa dextrosa agar / potato dextrose agar

² AA+SE: agar agua + Sulfato de estreptomomicina / water agar + Streptomycin sulphate

³ V8-PARB: jugo V8 + Pimaricina, Ampicilina, Rifampicina y Benomil / V8 juice + Pimaricin, Ampiciline, Rifampicine and Benomil

Los métodos de aislamiento se describen a continuación:

- *Diluciones seriadas de suelo [DS]*. De las muestras de suelo colectadas se tomaron 10 g de suelo de cada muestra y se diluyeron en 90 mL de agua destilada estéril; la mezcla se agitó y se realizaron diluciones seriadas descritas por Germida y de Freitas (2008) y Martínez Francés et al. (2009). De las series 10⁻³ y 10⁻⁴ se tomaron 200 µL y se depositaron en cinco platos Petri por cada medio de cultivo evaluado (Tabla 1).
- *A partir de raíces con síntomas de mal seco [RS]*. Se cortaron raíces jóvenes de 0,5 cm de largo que mostraban pequeñas manchas necróticas. Se lavaron con agua destilada estéril, se pasaron por hipoclorito de sodio (NaCl₃) al 1 % durante dos minutos y se realizó un enjuague con agua destilada estéril, luego fueron colocados en los platos Petri para su crecimiento (Tabla 1).
- *A partir de suelo con hojas de quequisque como cebo [HQC]*. Se utilizó la metodología de Almaraz-Sánchez et al. (2012) y Charlemagne y Xu (1997) modificadas, se esterilizaron trozos de hojas sanas de quequisque, aproximadamente de 0,2 cm², y se colocaron en un horno durante 72 h a 60 °C y 15 min bajo

luz ultravioleta. En un *beaker* se diluyeron 100 g de muestra de suelo por agitación en 300 mL de agua estéril. Se eliminaron raíces y materia orgánica flotante, posteriormente se dejaron reposar por 10 min. Se colocaron los trozos de hojas estériles y se incubaron por 72 h a 28 °C (Perneel et al., 2006). Se extrajeron los cebos de la solución de suelo, se lavaron con agua estéril, se secaron en papel filtro y se colocaron en cinco platos Petri por cada medio de cultivo (Tabla 1).

2.3. Identificación, caracterización y preparación de inóculos de microorganismos aislados

Se realizó la identificación y caracterización de los microorganismos aislados que se han reportado asociados al mal seco (Nzietchueng, 1984; Pacumbaba et al., 1992; Perneel et al., 2006; Saborío et al., 2004; Tambong et al., 1999).

2.3.1. *P. myriotylum*

La identificación se basó en las características morfológicas del oomicete descritas por Ali-Shtayeh (1986), Plaats-Niterink (1981) y Waterhouse y Waterston (1966). Se consideró la cantidad y diámetro de los oogonios, número de anteridios por oogonio, tipo de hifas y crecimiento micelial.

Los aislados de *P. myriotylum* que presentaron mayor crecimiento micelial y más caracteres morfológicos, se inocularon en el medio de cultivo donde se presentó el mejor crecimiento (V8-PARB) y se incubaron a 28 °C durante cinco días, después de este período, el micelio se mezcló con agua destilada estéril en un agitador durante dos minutos. Se ajustó la suspensión a la concentración 1×10^3 oogonios mL^{-1} con base en la metodología de Djeugap et al. (2016).

2.3.2. *Fusarium solani*

Se observó el crecimiento de *Fusarium* en tres medios de cultivo, y del medio donde tuvo mejor desarrollo fueron seleccionados los aislados para observar y describir las características morfométricas e identificar la especie como *F. solani*, según metodología de Seifert (1996) y Hafizi et al. (2013). Se consideró el color y pigmentación de la colonia, rango de crecimiento, morfología de las macroconidias y número de septos.

Antes de realizar la inoculación de *F. solani* aislado en plantas de quequisque, se comprobó su patogenicidad en plantas de melón con 15 días de desarrollo, después de la siembra en macetas. El inóculo se preparó en una suspensión madre y se aplicó 1 mL de esta suspensión en plántulas de melón, se realizaron dos huecos de 2 cm en el sustrato, al lado de la planta, de tal manera que las raíces quedaran descubiertas y se aplicaron 0,5 mL de la suspensión madre en cada hoyo.

El inóculo se preparó a partir de platos Petri que contenían *F. solani* con siete días de crecimiento en medio de cultivo PDA. Se le agregaron 20 mL de agua destilada estéril y se filtró a través de una gaza estéril a un *beaker* con 75 mL de agua destilada estéril y se agitó en un vórtex por un minuto. El recuento de conidias se realizó al agregar una gota de Tween 80 al 0,03 % a la suspensión y se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} y 10^{-2} . Se tomaron 50 μL de la última dilución para hacer el recuento con un hemocitómetro en un microscopio con visor 40X. La cantidad de conidias se ajustó según Corrales Ramírez et al. (2012) a una concentración de 1×10^4 esporas mL^{-1} .

2.3.3. Aislamiento de bacterias a partir de las muestras de suelo

Se preparó una solución de 10 g de suelo y 90 mL de agua estéril, se agitaron y se realizaron cinco diluciones seriadas. Se utilizaron las series 10^{-4} y 10^{-5} y se tomaron 0,10 mL de solución para depositarlos en platos Petri con medio tetrazolio [TZC]. El crecimiento de bacterias se observó 24 h después de la inoculación.

2.3.4. Identificación de bacterias

Se realizaron pruebas bioquímicas y tinciones para identificar las bacterias por género:

- *Prueba de KOH*: dos gotas de KOH al 3 % se colocaron en un porta-objetos donde se agregó una porción de la colonia de bacterias y se mezcló por dos minutos. Si al separar el asa de la mezcla se formaba una

hebra viscosa, la prueba resultaba positiva y la bacteria se considera Gram negativa y si no se formaba hebra, la reacción se considera negativa y la bacteria Gram positiva.

- *Prueba de oxidasa*: Se empleó la metodología de Goszczynska et al. (2000). Se utilizaron las bacterias Gram negativas identificadas en la prueba de KOH. Se colocaron dos gotas de diclorhidrato de tetra metil-p-fenilendiamina al 1 % en un trozo de papel filtro (1 cm²). Con un asa estéril se agregó una porción de una colonia de bacterias jóvenes (24 h). Si al minuto la muestra se tornaba color violeta oscuro era oxidasa positiva, y si no cambiaba de color era oxidasa negativa.
- *Pruebas bioquímicas*: Para la identificación de la bacteria por especie, se utilizaron las bacterias seleccionadas en las pruebas de oxidasa. Con un asa estéril se tomó una pequeña cantidad de colonia bacteriana y se depositó en tubos de ensayo con manitol, sorbitol, dulcitol, lactosa, maltosa y celobiosa de manera separada. En dependencia de los azúcares en los que las bacterias resultaron positivas y negativas, se identificó el biovar en correspondencia con la descripción de Schaad et al. (2001). Después de identificar las bacterias, estas se multiplicaron mediante la técnica de estriado en el medio de cultivo sólido agar nutritivo [AN] para purificar las colonias.

La preparación de la solución para la inoculación del suelo en las macetas se realizó según la metodología empleada por Rodríguez Zamora y Ramírez Reynoza (2012). La bacteria se diluyó en agua destilada estéril y se ajustó a 6×10^8 UFC mL⁻¹

2.4. Pruebas de patogenicidad realizadas en invernadero

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en el invernadero, según como se indica a continuación.

2.4.1. Ubicación del estudio para las pruebas de patogenicidad

El ensayo se estableció en el invernadero del Centro Nacional de Investigación Agropecuaria del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria [CNIA-INTA], Managua, localizado en las coordenadas 12°07'55.3"N 86°08'49.1"O. Durante el periodo de 11 semanas que duró el ensayo se registró una temperatura promedio entre 31,5 y 35,83 °C, máximas entre 35 y 39,3 °C y mínimas entre 28 y 32,3 °C (Figura 1).

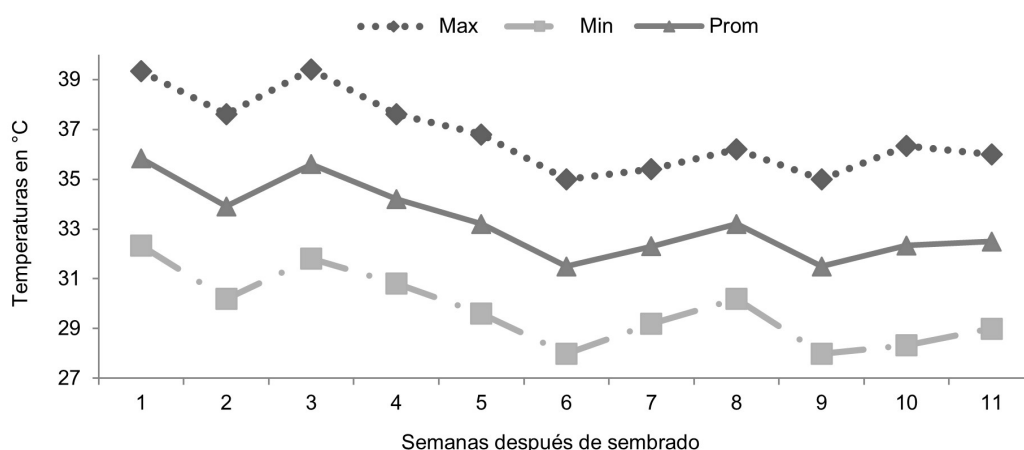


Figura 1. Temperaturas promedio, mínimas y máximas registradas en el invernadero del Centro Nacional de Investigación Agropecuaria del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria.

Figure 1. Average, minimum and maximum temperature recorded in the greenhouse at Centro Nacional de Investigación Agropecuaria del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria.

2.4.2. Aplicación de los postulados de Koch para las pruebas de la patogenicidad

Plantas *in vitro* del cultivar de quequisque lila se sembraron en macetas con suelo colectado en un sitio donde hubo plantaciones comerciales de quequisque en el municipio Nueva Guinea, por ser uno de los municipios con mayor producción de quequisque en Nicaragua y poseer suelos con la clasificación Ultisoles-HC Udults

(suelos en estado senil en última etapa de degradación de sus propiedades química por efecto de las lluvias de color rojizo o amarillento) de acuerdo con Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales [INETER] y Universidad Nacional Agraria [UNA] (2015). El suelo se esterilizó en horno a 240 °C por 72 h combinado con sustrato inerte (Kekkila) a una proporción de 3:1, de este material se utilizaron 2 kg por maceta.

2.4.3. Tratamientos utilizados

Se utilizaron 15 vitroplantas de 15 cm de altura con 100 días de aclimatadas en invernadero y con, al menos, tres hojas por tratamiento. Para evaluar las afectaciones se utilizaron tres plantas por tratamiento en cada evaluación a los 7, 21 y 35 días después de inoculadas [ddi].

Se evaluaron ocho tratamientos que corresponden con los tres patógenos aislados producto de la identificación y caracterización realizada previamente, la combinación de estos y un testigo absoluto (sin aplicación de patógeno):

- T.1: *Pythium myriotylum* [P].
- T.2: *Fusarium solani* [F].
- T.3: *Ralstonia solanacearum* [R].
- T.4: *Pythium myriotylum* + *Fusarium solani* [P+F].
- T.5: *Pythium myriotylum* + *Ralstonia solanacearum* [P+R].
- T.6: *Fusarium solani* + *Ralstonia solanacearum* [F+R].
- T.7: *Pythium myriotylum* + *Fusarium solani* + *Ralstonia solanacearum* [P+F+R].
- T.8: Testigo absoluto (sin inoculación de patógenos) [T].

Se inoculó *P. myriotylum* con 18,5 mL de suspensión de inóculo por maceta (Djeugap et al., 2016). Para inocular *F. solani* se utilizó 1 mL (1×10^4 esporas mL⁻¹) de la suspensión por maceta (Corrales Ramírez et al., 2012); y se inoculó según metodología empleada por Rodríguez Zamora y Ramírez Reynoza (2012) se aplicaron 3 mL de la solución bacteriana por maceta.

2.4.4. Re-aislamiento de patógenos de plantas de quequisque

Las plantas que presentaron síntomas del mal seco se procesaron en laboratorio a los 35 ddi, para re-aislar el patógeno presente en las raíces y el sustrato. Se utilizaron los medios de cultivo PDA, AA + SE y V8-PARB y se evaluaron las características morfométricas para comprobar la presencia del patógeno inoculado.

2.4.5. Variables evaluadas

Para evaluar los síntomas del mal seco en las plantas se registraron variables de raíces; a continuación se describen:

- a) *Número de raíces sanas*. El conteo de las raíces que no presentaron ningún tipo de lesión que indicase síntoma de ninguna enfermedad.
- b) *Número de raíces infectadas*. El conteo de todas las raíces de plantas que presentaron necrosis, marchitamiento y descortezamiento.
- c) *Largo de raíces*. Se midieron las raíces desde el inicio del cormo de la planta hasta la punta de esta, se tomaron medidas de cinco raíces tomadas al azar.
- d) *Incidencia de la enfermedad en raíces*. Se evaluó con la ecuación [1] (Djeugap et al. 2016)

$$I = \frac{\text{Número de raíces infectadas de la planta}}{\text{Número total de raíces de la planta}} \times 100 \quad [1]$$

2.5. Análisis de datos

A las variables raíces sanas, número de raíces afectadas, largo de raíces se les realizó un análisis de varianza [ANDEVA] y separación de media de Fisher $\alpha = 0,05$ para determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos con el programa InfoStat versión 2018e.

3. Resultados

3.1. Aislamientos de patógenos asociados al mal seco según los métodos empleados

Se registraron 119 aislados de *Pythium* spp. y 61 aislados de *Fusarium* spp. Con el método HQC se obtuvieron 16 aislados de *Fusarium* spp. y siete *Pythium* spp. en el medio PDA. En el medio AA+SE 16 aislados de *Fusarium* spp. y 30 de *Pythium* spp. y en el medio V8-PARB 33 aislados de *Pythium* spp. (Tabla 2).

Tabla 2. Número de aislados (*Fusarium* spp. y *Pythium* spp.) obtenidos con los métodos de aislamiento: hoja como tejido trampa de quequisque (*Xanthosoma violaceum*) [HQC], raíces con síntomas [RS] y diluciones seriadas de suelo [DS], en los medios de cultivo patata dextrosa agar [PDA], agar agua con sulfato de estreptomicina [AA+SE] y jugo V8 con pimaricina, ampicilina, rifampicina y benomil [V8-PARB].

Table 2. Number of isolates (*Fusarium* spp. and *Pythium* spp.) obtained with the isolation methods: leaves as bait (*Xanthosoma violaceum*) [HQC], roots with symptoms [RS] and serial dilutions of soil [DS], in the culture media Potato Dextrose Agar [PDA], water agar with streptomycin sulfate [AA+SE] and V8 Juice with Pimaricin, Ampicillin, Rifampicin and Benomil [V8-PARB].

Medios de cultivo	HQC		RS		DS		Total	
	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Pythium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Pythium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Pythium</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Pythium</i> spp.
PDA	16	7	1	0	27	21	44	28
AA+SE	16	30	0	0	1	28	17	58
V8PARB	0	33	0	0	0	0	0	33
Total	32	70	1	0	28	49	61	119

Con el método RS se obtuvo un crecimiento de *Fusarium* spp. en PDA. Con el método DS crecieron 27 aislados de *Fusarium* spp. y 21 de *Pythium* spp. en el medio PDA y en el medio AA+SE creció un aislado de *Fusarium* spp. y 28 aislados de *Pythium* spp. No hubo crecimiento en el medio V8-PARB (Tabla 2).

En el medio de cultivo PDA, creció *Fusarium* spp., que presentó el característico crecimiento micelial septado, con colonias de colores entre rosado y lila, con macroconidias con curvaturas entre 3-4 septos, identificado después de siete días de sembrado. El crecimiento de *Fusarium* en AA+SE fue escaso y no se logró observar claramente las estructuras de reproducción, lo que dificultó identificar la especie en este medio.

En el medio de cultivo AA+SE se obtuvieron 58 aislados de *Pythium* spp. con un crecimiento lateral y escaso del micelio dentro del medio de cultivo. Con el método HQC, se obtuvieron 70 aislados de *Pythium* spp. 58,8 % del total de aislados de *Pythium* spp. con crecimiento micelial muy algodonoso, ascendente y abundante en el plato Petri en el medio de cultivo V8-PARB (33 aislados) en comparación con los medios de cultivo PDA (7 aislados) y AA+SE (30 aislados) y fue el único patógeno que creció en este medio.

3.2. Identificación de patógenos

Se identificó el patógeno *Pythium myriotylum* aislado del método HQC en el medio de cultivo V8-PARB a los tres días después de sembrado a una temperatura de 28 °C. presentó micelio ascendente de color blanco y algodonoso con gran cantidad de oogonios de 23 µm de diámetro, de forma redonda con doble pared y de 1 a 3 anteridios por oogonio, con abundantes oosporas con hifas cenocíticas, desarrollo de esporangios filamentosos (Figura 2). Todos los aislados de *P. myriotylum* virulentos de quequisque crecen mejor a 28 °C (Perneel et al., 2006). No se logró identificar la especie *P. myriotylum* en los otros medios debido a la carencia de estructuras reproductivas y poco desarrollo del micelio.

Fusarium solani se aisló e identificó con el método DS en el medio de cultivo PDA. Presentó micelio aéreo y textura algodonosa de colores entre blanco grisáceo y rosado con pigmentaciones de colores entre lila, púrpura y marrón, hifas septadas y cantidades abundantes de microconidias con 3-4 septos, como las descritas por Seifert (1996), Rodríguez Zamora y Ramírez Reynoza (2012), y Hafizi et al. (2013) (Figura 3). No se logró identificar la especie en los aislados de PDA de los métodos RS y HQC por presentarse poco micelio (Tabla 2).

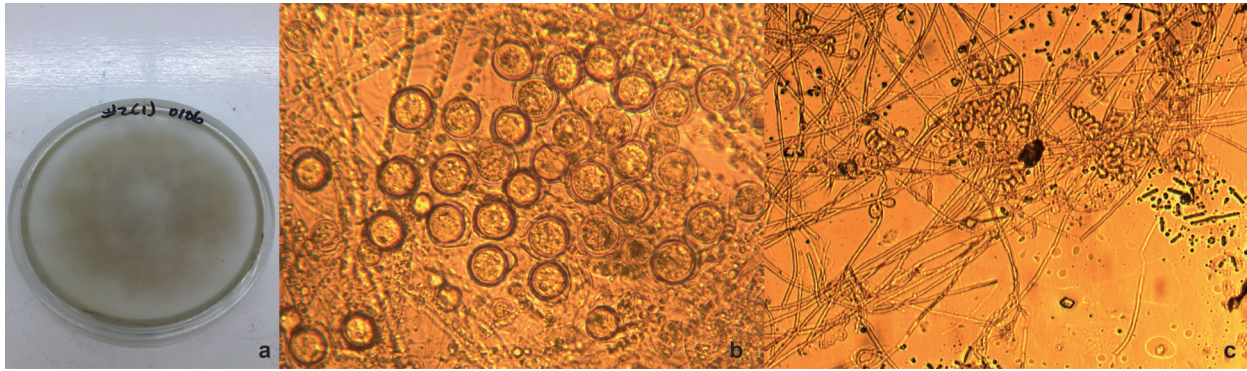


Figura 2. Estructuras de *P. myriotylum* observadas bajo el microscopio a 40X e identificadas mediante claves taxonómicas
 a) Crecimiento de *P. myriotylum* en medio de cultivo jugo V8 con pimarcina, ampicilina, rifampicina y benomil,
 b) oogonios, c) hifas cenocíticas y esporangios.

Figure 2. *Pythium myriotylum* structures observed under the microscope 40X and identified by taxonomic keys
 a) Growth of *Pythium myriotylum* in culture medium V8 with Pimaricin, Ampicilin, Rifampicin and Benomil medium
 b) Oogonia c) Coenocytic hyphae and sporangia.

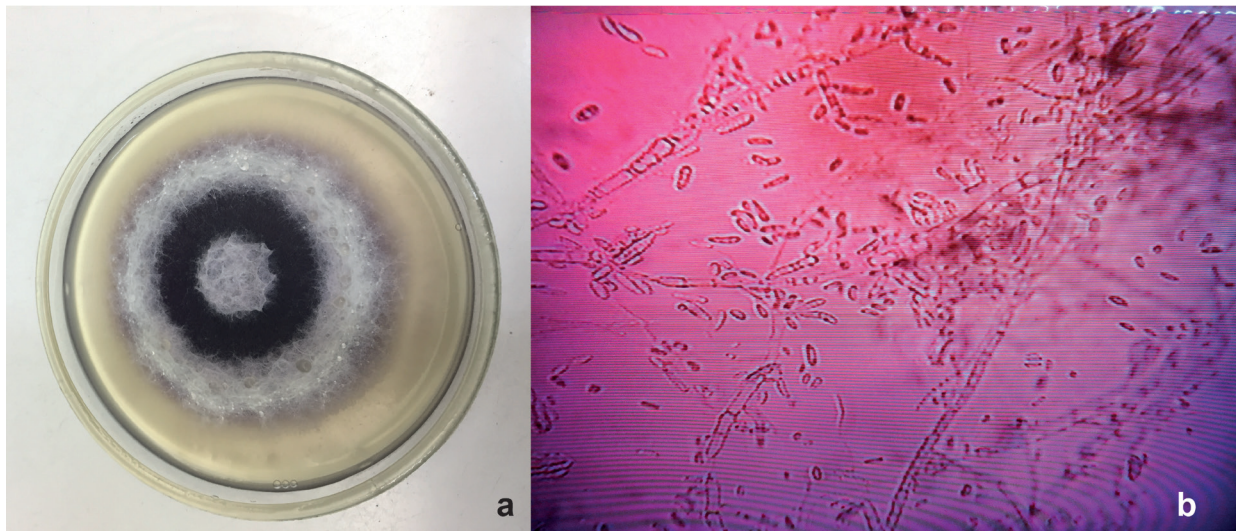


Figura 3. a) Crecimiento de *F. solani* en medio de cultivo PDA a los ocho días de sembrado en medio,
 b) Identificación morfológica de *F. solani*, hifas y macroconidias.

Figure 3. a) Growth of *F. solani* in PDA culture medium eight days after inoculation in medium,
 b) Morphological identification of *F. solani*, hyphae and macroconidia.

Se identificó a *Ralstonia solanacearum* biovar 2, después de realizar las pruebas KOH, oxidasa y bioquímicas, resultaron positivos los azúcares maltosa, celobiosa y lactosa, que corresponde a la bacteria *R. solanacearum*, según la descripción de Schaad et al. (2001).

3.3. Pruebas de patogenicidad con base en los postulados de Koch

En las pruebas de patogenicidad, los tratamientos combinados con *P. myriotylum* mostraron síntomas de afectación en las raíces. A continuación, se muestran en cada una de las variables:

- Las plantas evaluadas mostraron valores promedios de raíces sanas en rangos de 4,7-20,7 con longitudes de 5,7-24,8 cm, y con un rango promedio de 0-11 raíces afectadas. Se registraron diferencias significativas entre los tratamientos en todas las variables y todas las evaluaciones, con excepción del largo de raíces a los 35 ddi (Tabla 3).
- El número de raíces afectadas, en los tratamientos R, F, F+R y T, registraron la misma categoría en todas las evaluaciones, y se observaron plantas con raíces sin ninguna afectación (Tabla 3).
- Los tratamientos P+R, P, P+F+R y P+F se ubicaron en la segunda categoría, con raíces necróticas, pudrición, lesiones y descortezamiento en las mismas, síntomas característicos del mal seco. Estas afectaciones se atribuyen a un patógeno común en estos tratamientos: *P. myriotylum* (Tabla 3).

Tabla 3. Separación de medias de Fisher ($\alpha = 0,05$), P valor, coeficiente de variación [CV] y coeficiente de determinación [R²] del número de raíces sanas, raíces afectadas y largo de raíces de vitroplantas del cultivar de quequisque lila (*Xanthosoma violaceum*), evaluadas a los 7, 21 y 35 días después de la inoculación, en las pruebas de patogenicidad con base en los postulados de Koch.
Table 3. Fisher's mean separation ($\alpha = 0,05$), P value, coefficient of variation [CV] and coefficient of determination [R²] of the number of healthy roots, affected roots and root length of vitroplants of the Lila cocoyam (*Xanthosoma violaceum*) cultivar evaluated at 7, 21 and 35 days after inoculation, in pathogenicity tests based on Koch's postulates.

Tratamientos	Número de raíces afectadas			Número de raíces sanas			Largo de raíces (cm)		
	Días después de la inoculación								
	7	21	35	7	21	35	7	21	35
R	0,33 a	0,33 a	0,33 a	13,00 a	12,00 b c	13,00 abc	8,78 cd	22,63 ab	19,33 a
F	0,00 a	0,67 a	0,33 a	14,67 a	14,33 abc	18,00 a	9,71 bcd	12,70 cd	16,97 a
F+R	0,67 a	0,67 a	0,67 a	16,33 a	11,00 bc	14,33 ab	5,68 d	24,78 a	19,16 a
T	0,67 a	0,33 a	0,67 a	13,00 a	16,67 ab	15,33 ab	12,27 bc	15,59 bcd	17,28 a
P+R	6,67 b	6,67 b	9,00b	9,67 a	11,00 bc	13,67 ab	20,20 a	13,00 cd	22,77 a
P	4,67 b	8,67 b	10,67 b	15,33 a	16,33 bc	4,67 d	9,40 bcd	11,44 d	19,17 a
P+F+R	4,67 b	6,37 b	11,00 b	17,00 a	8,33 c	7,33 cd	13,83 b	20,27 abc	17,15 a
P+F	2,67 b	6,00 b	11,00 b	17,33 a	20,67 a	9,67 bcd	6,72 d	11,30 d	12,67 a
P valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,1086	0,0174	0,0028	0,0002	0,0112	0,5331
CV (%)	44,72	54,21	23,95	21,29	26,6	27,8	25,53	28,43	29,16
R ²	0,87	0,80	0,96	0,47	0,61	0,70	0,79	0,63	0,28

Las plantas de los tratamientos F, R, F+R y T tuvieron un crecimiento normal y el porcentaje de incidencia de la enfermedad en las raíces fue menor al 10 por ciento en todas las evaluaciones. Por otra parte, las raíces de las plantas de los tratamientos P, P+F, P+R y P+F+R mostraron un aumento de la incidencia de la enfermedad al pasar los 7 días después de haber sido inoculadas, con síntomas de necrosis y marchitamiento en las raíces (Figura 4).

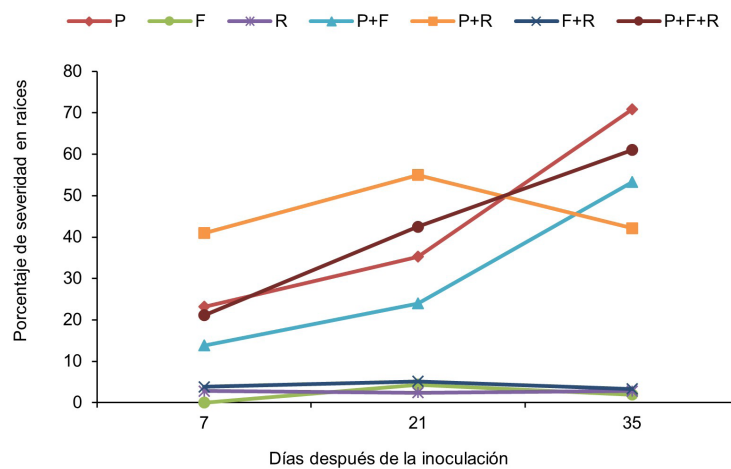


Figura 4. Porcentaje de incidencia de la enfermedad en las raíces de plantas *in vitro* del cultivar quequisque lila (*Xanthosoma violaceum*), inoculado con aislados patogénicos *P. myriotylum* [P], *F. solani* [F], *R. solanacearum* [R] aplicados solos y en combinación (P+F, P+R, F+R, P+F+R) y testigo [T] sin inoculación de patógenos.

Figure 4. Percentage of disease incidence registered in the roots of *in vitro* plants of the cultivar quequisque Lila (*Xanthosoma violaceum*), inoculated with pathogenic isolates *P. myriotylum* [P], *F. solani* [F], *R. solanacearum* [R] applied alone and in combination (P + F, P + R, F + R, P + F + R) and control [T] without pathogen inoculation.

3.4. Re-aislamiento de patógenos de plantas de quequisque con síntomas de mal seco

Los patógenos aislados de las plantas con síntomas de mal seco fueron los mismos patógenos inoculados en la prueba de patogenicidad, cumpliéndose con el postulado número 4 de Koch, según Agrios (2005) (Tabla 4).

Pythium myriotylum fue aislado de todos los tratamientos (P, P+F, P+R y P+F+R) en dos medios de cultivos AA+SE y V8+PARB (Tabla 4).

Tabla 4. Re-aislamiento de patógenos encontrados en plantas de quequisque (*Xanthosoma violaceum*) con síntomas de mal. **Table 4.** Re-isolation of pathogens found in cocoyam (*Xanthosoma violaceum*) plants with symptoms of dry rot disease.

Medios de cultivos	P	P+F	P+R	P+F+R
PDA ¹	---	<i>F. solani</i>	---	<i>F. solani</i>
AA + SE ²	<i>P. myriotylum</i>	<i>P. myriotylum</i>	<i>P. myriotylum</i>	<i>P. myriotylum</i>
V8 + PARB ³	<i>P. myriotylum</i>	<i>P. myriotylum</i>	<i>P. myriotylum</i>	<i>P. myriotylum</i>
TZC ⁴	---	---	<i>R. solanacearum</i>	<i>R. solanacearum</i>

¹PDA: Papa dextrosa agar / *potato dextrosa agar*

²AA+SE: Agar agua más sulfato de estreptomina / *water agar+ Streptomine sulphate*

³V8+PARB: Jugo V8 más Pimaricina, Ampicilina, Rifampicina y Benomil / *V8 juice + Pimaricin, Ampiciline, Rifampicine and Benomil*

⁴TZC: Tetrazolio / *Tetrazolium*

4. Discusión

El empleo del método de captura HQC en combinación con el medio de cultivo V8+PARB resultó ser el más efectivo para el aislamiento y crecimiento de *Pythium myriotylum*. Al estar *P. myriotylum* en un medio acuoso y al entrar en contacto con las hojas se crearon las condiciones para su germinación y desarrollo, lo que facilitó su aislamiento, al encontrarse mayor cantidad de micelio en los trozos de hojas. La humedad del suelo puede afectar la producción de esporangios, desarrollo de anteridios, oogonios y desarrollo de micelio de *Pythium* (Yudiarti et al., 2006). Esta combinación de técnicas garantiza tener aislados de *P. myriotylum* sin necesidad de utilizar plantas de quequisque con afectaciones recientes del mal seco. A menudo el aislamiento debe realizarse de tejido muy deteriorado que puede contener propágulos inactivos de *Pythium* por lo que es preferible que el medio permita que las esporas germinen y se desarrollen más fácilmente (Jeffers y Martin, 1986).

Otros autores aislaron *Pythium* con tejido trampa de chiltoma (*Capsicum annuum* L.), en suelo humedecido a saturación y medio de cultivo agar harina de maíz y jugo V8 suplementados con los antibióticos pimaricina, vancomicina y pentanitroclorobenceno; y obtuvieron crecimiento micelial abundante, que saturó la caja Petri en el medio de cultivo V8, lo que facilitó la identificación y manipulación de este (Urrutia-Anaya y Pacheco-Aguilar, 2009), este mismo crecimiento se presentó en este estudio en el medio de cultivo V8+PARB, lo que facilitó la identificación de *P. myriotylum* en comparación con los otros medios utilizados (AA+SE y PDA), donde el crecimiento fue escaso y no se presentaron estructuras de reproducción para poder realizar la identificación de la especie, por lo que solo fue posible llegar hasta nivel de género en los aislados encontrados en estos medios.

Contar con un medio de cultivo donde se desarrolle *P. myriotylum* es de gran importancia para facilitar su identificación. El medio de jugo V8 con diferentes antibióticos se utilizó anteriormente y se demostró la importancia del uso de antibióticos en medios de cultivos selectivos para el crecimiento y desarrollo del patógeno (Jeffers y Martin, 1986; Rodríguez Zamora y Ramírez Reynosa, 2012; Urrutia-Anaya y Pacheco-Aguilar, 2009). El uso de antibióticos (pimaricina, ampicilina y rifampicina) y fungicidas (benomil) en el medio de cultivo V8+PARB inhibió el crecimiento de bacterias y hongos que están presentes en el suelo, lo que permitió un desarrollo exuberante de *P. myriotylum*, lográndose observar estructuras reproductivas que facilitaron su identificación. En los medios AA+SE y PDA crecieron otros hongos y bacterias que en algunos casos saturaron los medios de cultivos y no era posible realizar la identificación de las especies presentes en el medio. A pesar de que *Pythium* spp. produce profusamente sus estructuras en el suelo, es difícil recuperarlo en el medio, debido a que *Pythium* crece menos que otros hongos o bacterias, por lo tanto se requiere una técnica especial (Yudiarti et al., 2006)

Los aislados de *P. myriotylum* que infectan a quequisque son diferentes del aislado típico de *P. myriotylum* que causa damping off en otras plantas hospederas y pueden ser distinguidos de otros aislados de *P. myriotylum* por su temperatura óptima de crecimiento en laboratorio (28 °C) (Perneel et al., 2006) utilizada en este estudio en el aislamiento y multiplicación del oomicete. Para el aislamiento e identificación de *Pythium* son necesarios medios que permitan estimular la formación de las estructuras como esporangios, oogonios y anteridios para poder identificarlo, ya que en *Pythium* la morfología de los esporangios es clave para su identificación (Urrutia-Anaya y Pacheco-Aguilar, 2009).

Las dificultades del aislamiento de *P. myriotylum* a partir de raíces (visibilidad de los primeros síntomas en raíces y medios de cultivos específicos) podrían explicar las diferencias en la definición del agente causal de mal seco en quequisque. Algunos autores atribuyen a *F. solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc y un complejo de hongos los síntomas de mal seco (Dávila Martínez, 2011; Dávila Martínez et al., 2016; Folgueras Montiel et al., 2015; Saborío et al., 2004). En las variables incidencia de la enfermedad en raíces y número de raíces afectadas (Tabla 3 y Figura 3) *P. myriotylum* está presente en los tratamientos que muestran plantas con síntomas de mal seco, como necrosis y marchitamiento en las raíces, lo que comprueba los resultados de Nzietchueng (1984); Pacumbaba et al. (1992); Tambong et al. (1999), y en Nicaragua Rodríguez Zamora y Ramírez Reynoza (2012), quienes presentan a *P. myriotylum* como el único agente causal de mal seco en quequisque.

5. Conclusiones

El método de aislamiento de *Pythium myriotylum*, a partir de suelo con hojas de quequisque como tejido trampa, resultó ser efectivo. Al combinar este método con el medio de cultivo jugo V8 más pimaricina, ampicilina, rifampicina y benomil, se obtuvo mayor cantidad de aislados de *P. myriotylum* con micelio abundante que facilitaron su identificación morfométrica. *P. myriotylum* provocó síntomas característicos de mal seco en las vitroplantas de quequisque lila. Las plantas inoculadas con *F. solani* y *R. solanacearum* solos o combinados no presentaron síntomas de mal seco.

Contribuciones de los autores

- Heedy Guadalupe Corea Narváez: conceptualización, análisis formal, investigación, metodología, redacción - borrador original.
- Rayan Oniel Gonzalez Moya: investigación, metodología.
- Guillermo del Carmen Reyes Castro: conceptualización, adquisición de fondos, administración del proyecto, recursos, supervisión.

Implicaciones éticas

Los autores declaran que no existen implicaciones éticas.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés financieros o no financieros que podrían haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

Referencias

Acebedo Rivera, J. A., y Navarro Matute, E. R. (2010). Efectos del mal seco (*Phyitium myriotylum* Drechs) en campo y sombreadero sobre la agromorfología de 15 accesiones de quequisque (*Xanthosoma spp.*), desarrollo de síntomas y detección microbiológica. Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2120>

- Agrios, G. N. (2005). *Fitopatología* (2ª ed.). Limusa S.A.
- Ali-Shtayeh, M. S. (1986). *The genus pythium in the west bank and Gaza Strip*. Research and Documentation Centre, An-Najah National University. <https://staff-old.najah.edu/msshtayeh/published-book/genus-pythium-west-bank-and-gaza-strip>
- Almaraz-Sánchez, A., Alvarado-Rosales, D., y Saavedra-Romero, L. de L. (2012). Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 19(1), 5-12. www.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.062
- Bejarano-Mendoza, C. A., Zapata, M., Bosques, A., Rivera-Amador, E., y Liu, L. J. (1998). *Sclerotium rolfsii* como componente del complejo patológico causante del mal seco de la yautía (*Xanthosoma sagittifolium*). *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 82(1-2), 85-95. <https://doi.org/10.46429/jaupr.v82i1-2.3822>
- Cañedo, V., y Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa. <https://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Charlemagne, T. T. J., y Xu, T. (1997). *Pythium* species from cocoyam farm soils in Cameroon. *Fungal Science*, 12(1/2), 9-15.
- Corrales Ramírez, L. C., Sánchez Leal, L. C., Cuervo Andrade, J. L., Joya, J. A., y Márquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Revista Nova Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(17), 64-82. <https://doi.org/10.22490/24629448.518>
- Dávila Martínez, A. (2011). *Las pudriciones secas de la malanga (Xanthosoma y Colocasia)*. Etiología y sintomatología. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. <https://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/2173>
- Dávila Martínez, A., Herrera Isla, L., Folgueras Montiel, M., y Espinosa-Cuellar, E. (2016). Patogenicidad de especies fúngicas presentes en los rizomas de malanga (*Xanthosoma* y *Colocasia*). *Centro Agrícola*, 43(2), 49-58. http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V43-Numero_2/cag07216.pdf
- Djeugap, F. J., Azia, A. T., Tita, N. C., Eko, D., y Fontem, D. A. (2016). Influence of compost types and fungicide application on plant growth and suppressiveness of cocoyam [*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott] root rot disease. *International Journal of Agriculture and Bioscience*, 5(1), 32-37. <https://www.ijagbio.com/pdf-files/volume-5-no-1-2016/32-37.pdf>
- Folgueras Montiel, M., Herrera Isla, L., y Rodríguez Morales, S. (2015). El mal seco de la malanga (*Xanthosoma* y *Colocasia*) en Cuba. *Revista Agricultura Tropical*, 1(1), 62-65.
- Germida, J. J., y de Freitas, J. R. (2008). Cultural methods for soil and root associated microorganisms. En M. R. Carter, y E. G. Gregorich (eds.), *Soil sampling and methods of analysis* (2ª ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420005271>
- Giacometti, D. C., y Leon, J. (1994). Tannia, yautia (*Xanthosoma sagittifolium*). En J. E. Hernández Bermejo, y J. León (eds.), *Neglected Crops: 1492 from a different perspective* (pp. 253-258). FAO Plant Production and Protection Series No.26. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/4/t0646e/t0646e.pdf>
- Gómez-Alpízar, L., Saalau, E., Picado, I., Tambong, J. T., y Saborío, F. (2011). A PCR-RFLP assay for identification and detection of *Pythium myriotylum*, causal agent of the cocoyam root rot disease. *Letters in Applied Microbiology*, 52(3), 185-192. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02998.x>
- Goszczyńska, T., Serfontein, J. J., y Serfontein, S. (comps.). (2000). *Introduction to practical phytobacteriology: A manual for phytobacteriology* (1ª ed.). Safrinet-Loop of bioNet-International. <https://ipmil.cired.vt.edu/wp-content/uploads/2014/06/Practical-Bacteriology-Guide-copy.pdf>
- Hafizi, R., Salleh, B., y Latiffah, Z. (2013). Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 959-968. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300047>
- Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales [INETER], y Universidad Nacional Agraria [UNA]. (2015). *Mapa de suelos de la República de Nicaragua*. INETER.
- Jeffers, S. N., y Martin, S. B. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, 70(11), 1038-1043. <https://doi.org/10.1094/PD-70-1038>
- Martínez Francés, M. Á., Lacasa Plasencia, A., y Tello Marquina, J. C. (2009). *Ecología de la microbiota fúngica de los suelos de los invernaderos de pimiento y su interés agronómico*. Ministerio de Medio Am-

- biente y Medio Rural y Marino. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/ECOLOGIA%20MICROBIOTA%20baja_tcm30-57876.pdf
- Nyochembeng, L. M., Pacumbaba, R. P., y Beyl, C. A. (2002). Calcium enhanced zoospore production of *Pythium myriotylum* in vitro. *Journal of Phytopathology*, 150(7), 396-398. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00759.x>
- Nzietchueng, S. (1984). Root rot *Xanthosoma sagittifolium* caused by *Pythium myriotylum* in Camerun. En E. R. Terry, E. V. Doku, O. B. Arene, y N. M. Mahungu (eds.), *Tropical root crops: production and uses in Africa. Proceedings of the second triennial Symposium of the international society of tropical Root crops* (pp. 185-188). International Development Research Centre. <https://idl-bnc-idrc.dspacedirect.org/server/api/core/bitstreams/5598eb2e-0462-4abe-a928-38e051112bbb/content>
- Olorunleke, F., Adiobo, A., Onyeka, J. T., y Höfte, M. (2014). Cocoyam root rot disease caused by *Pythium myriotylum* in Nigeria. En *Tropentag 2014: Conference on International Research -on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development*. Praga, República Checa. https://www.tropentag.de/2014/abstracts/links/Houmlfte_5jvOBYj9.pdf
- Pacumbaba, R. P., Wutoh, J. G., Eyango, S. A., Tambong, J. T., y Nyochembeng, L. M. (1992). Isolation and pathogenicity of rhizosphere fungi of cocoyam in relation to cocoyam root rot disease. *Journal of Phytopathology*, 135(4), 265-273. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1992.tb04312.x>
- Perneel, M., Tambong, J. T., Adiobo, A., Floren, C., Saborío, F., Lévesque, A., y Höfte, M. (2006). Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. *Mycological Research*, 110(5), 583-593. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.12.002>
- Plaats-Niterink, J. van der. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*, (21). <https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim21/full%20text.htm>
- Reyes Castro, G. (2006). Studies on cocoyam (*Xanthosoma* spp.) in Nicaragua, with emphasis on *Dasheen mosaic virus*. Swedish University of Agricultural Sciences. <https://res.slu.se/id/publ/13224>
- Reyes Castro, G. del C., Corea Narváez, H. G., y Guatemala Ortega, T. (2013). *Guía del manejo agronómico del quequisque en Nicaragua*. Programa Propemce. <https://cenida.una.edu.ni/relectronicos/REN-F01R457g.pdf>
- Rodríguez Zamora, M. J., y Ramírez Reynoza, D. J. (2012). *Diagnóstico de los agentes causales del mal seco en el cultivo de quequisque (Xanthosoma spp.) en el municipio de Nueva Guinea, Nicaragua*. <https://repositorio.una.edu.ni/2161/>
- Saavedra, D., y Reyes, G. (2012). *Prospección tecnológica para el manejo de mal seco en quequisque*. FUNICA.
- Saborío, F., Umaña, G., Solano, W., Amador, P., Munos, G., Valerin, A. T., Torrez, S., y Valverde, R. (2004). Induction of genetic variation in *Xanthosoma* spp. En International Atomic Energy Agency, *Genetic improvement of under-utilized and neglected crops in low income food deficit countries through irradiation and related techniques* (pp. 143-154). International Atomic Energy Agency. <https://www.iaea.org/publications/7155/genetic-improvement-of-under-utilized-and-neglected-crops-in-low-income-food-deficit-countries-through-irradiation-and-related-techniques>
- Schaad, N. W., Jones, J. B., y Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3rd ed.). American Phytopathological Society Press. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>
- Seifert, K. (1996). *Fuskey: Fusarium interactive key, taxonomic information systems*. Agriculture & Agri-Food Canada. <https://www.pilzforum.eu/attachment/433750-fusarium-key-pdf/>
- Sinobas, J., Varés, J., y Rodríguez, E. (1999). Influencia del tipo de «cebo» y la temperatura en el aislamiento y desarrollo de *Pythium* spp. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 25(2), 131-142. https://www.mapa.gob.es/app/publicaciones/art_datos_art.asp?articuloId=836&codrevista=Plagas
- Steiner, K. G. (1981). A root rot of macabo (*Xanthosoma* sp.) in Cameroun, associated with *Pythium myriotylum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 88(10), 608-613. <https://www.jstor.org/stable/43216229>
- Tambong, J. T., Poppe, J., y Höfte, M. (1999). Pathogenicity, electrophoretic characterization and in planta detection of the cocoyam root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 597-607. <https://doi.org/10.1023/A:1008745732733>
- Waterhouse, G. M., y Waterston, J. M. (1966). *Pythium myriotylum*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. *Descriptions of Fungi and Bacteria*. <https://doi.org/10.1079/DFB/20056400118>

- Urrutia-Anaya, I., y Pacheco-Aguilar, J. R. (2009). *Aislamiento e identificación de Pythium sp., un fitopatógeno de interés agrícola en el estado de Querétaro*. Universidad Autónoma de Querétaro. https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2009/11VCRC_46/35_Urrutia_Anaya_Color.pdf
- Yudiarti, T., Jensen, D. F., y Hockenull, J. (2006). Isolation and identification of *Pythium* from soil. *Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis*, 3(31), 141-146. <http://eprints.undip.ac.id/6894/>