

**FUNDAMENTOS BÁSICOS PARA EL DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO
DEL HONGO *Phoma exigua* PRESENTE EN SEMILLAS DE FRÍJOL Y
FORRAJES TROPICALES EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

JULIO CÉSAR RAMÍREZ PRETELT



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2021**

**FUNDAMENTOS BÁSICOS PARA EL DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO DEL
HONGO *Phoma exigua* PRESENTE EN SEMILLAS DE FRÍJOL Y FORRAJES
TROPICALES EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

JULIO CÉSAR RAMÍREZ PRETELT

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Magister en Microbiología Agroindustrial**

Director:

NARMER FERNANDO GALEANO VANEGAS

Co-director:

MARITZA CUERVO IBAÑEZ

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES**

2021

Nota de aceptación

Firma de Director del Trabajo de Grado

Firma del presidente del Comité de Programa

Firma de integrante del Comité de Programa

Manizales, 18 de enero de 2021.

DEDICATORIA

Dedicado a la memoria de mi abuela Ana Josefa Vargas González quien a través de sus oraciones y amor incondicional sé que me está apoyando desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Instituciones y oficinas:

Al Programa de Recursos Genéticos de la Alianza Bioersity International y CIAT, especialmente al Laboratorio de Sanidad de Germoplasma por la financiación del trabajo de grado a través de este proyecto, así como al grupo de trabajo.

Universidad Católica de Manizales:

Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial

Docentes e investigadores:

Al docente Narmer Fernando Galeano, director del trabajo de grado.

A la Coordinadora del Laboratorio de Sanidad de Germoplasma, Maritza Cuervo Ibáñez codirectora del trabajo, por el apoyo constante en el planteamiento y desarrollo del mismo.

Agradecimientos personales:

A mis padres Denis y Federico, a mis hermanos Harold Andrés y Carlos Alberto y en especial a mis amigos por su apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso.

CONTENIDO

1. Introducción.....	12
2. Marco teórico.....	17
2.1 <i>Hacia el interior del diagnóstico fitosanitario: Laboratorio de Sanidad de Germoplasma</i>	17
2.2 <i>Limitaciones durante la identificación de caracteres morfológicos</i>	26
2.3 <i>Tendencia del diagnóstico de hongos en semillas</i>	32
3. Planteamiento del problema	33
4. Justificación	35
5. Objetivos.....	35
5.1 Objetivo general	35
5.2 Objetivos específicos.....	36
6. Metodología.....	36
7. Resultados de las búsquedas.....	38
8. Revisión bibliográfica.....	38
8.1 <i>Generalidades de los hongos</i>	38
8.2 <i>Clasificación taxonómica de los hongos</i>	39
8.3 <i>Generalidades de Phoma sp.</i>	40
8.4 <i>Una mirada hacia la biología de Phoma sp.</i>	43
8.5 <i>Ciclo de vida: Phoma sp.</i>	44
8.7 <i>Definición taxonómica del género Phoma sp.</i>	46
8.7.1 <i>Nomenclatura del género Phoma sp.</i>	47
8.7.2 <i>Teleomorfos relacionados</i>	49
8.7.3 <i>Sinanamorfos correlacionados</i>	49
8.8 <i>Consideraciones sistemáticas del género Phoma sp.</i>	52
8.9 <i>Conceptos generales para determinar especies del género Phoma sp.</i>	53
8.10 <i>Enfoques basados en el ADN en la taxonomía de Phoma sp.</i>	57
8.11 <i>Número de especies reportadas en el género Phoma sp.</i>	58
8.12 <i>Futuro de las investigaciones basadas en la taxonomía de Phoma sp.</i>	60
8.13 <i>Complejidades de la especie Phoma exigua</i>	61
8.14 <i>Nomenclatura actual y reubicación taxonómica de Phoma exigua</i>	62
8.14.1 <i>Sinonimias</i>	62

8.15 Metodologías empleadas para la identificación del complejo <i>Phoma</i> sp.....	70
8.15.1 Metabolito “E”	70
8.15.2 Cristalización de los pigmentos de antraquinona	71
8.15.3 Detección de la producción de crisofanol	72
8.15.4 Detección de la producción de liasas	72
8.15.5 Técnica inmunoenzimática ELISA	73
8.15.6 Espectrofotometría de masas (EM)	74
8.15.7 Utilización de medios de cultivo semi-selectivos	75
8.15.8 Desarrollo de protocolos para obtención de ADN fúngico.....	75
8.15.9 Contribuciones taxonómicas para el diagnóstico basado en caracteres morfológicos....	76
8.15.10 Uso de marcadores moleculares	77
8.15.11 Utilización de cebadores universales y bases de datos	82
8.15.12 Utilización de marcadores filogenéticos	82
8.15.13 Desarrollo de PCR convencional y PCR en tiempo real.....	84
8.15.14 Análisis de secuencias multi-locus	85
9. Flujo de trabajo para desarrollar una metodología de diagnóstico molecular: <i>P. exigua</i> (B. exigua nov.).....	86
9.1 Identificar regiones de ADN disponibles en bases de datos que permitan la diferenciación de especies del género <i>Phoma</i> sp.....	86
9.1.1 Obtención de secuencias de genes usados en filogenia de bases de datos públicas. (Genes: ITS, β -tubulina, ACT, LSU y TEF)	86
9.1.2 Alinear secuencias mediante el uso del Software bioinformático MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).	89
9.1.3 Construcción de árboles filogenéticos.	90
9.1.4 Selección de genes para identificar molecularmente el hongo <i>P. exigua</i>	92
9.2 Validar <i>in silico</i> y en laboratorio cebadores específicos para <i>P. exigua</i> en una población de prueba.	93
9.2.1 Diseñar cebadores específicos para la identificación molecular hasta nivel de especie de <i>P. exigua</i>	93
9.2.2 Extraer y cuantificar ADN de población prueba con hongos pertenecientes al género <i>Phoma</i> sp.	94
9.2.3 Evaluar la calidad de los cebadores diseñados mediante el análisis <i>in silico</i> en cuanto a especificidad y eficiencia de la reacción de PCR para la síntesis de tres parejas de cebadores promisorios.	95
9.2.4 Diseño y corrido de la reacción de PCR.....	95

9.2.5	<i>Secuenciar por método Sanger los productos de la PCR obtenidos.</i>	95
9.2.6	<i>Comparar las secuencias obtenidas en bases de datos para la identificación molecular de P. exigua.</i>	96
9.2.7	<i>Alinear secuencias mediante el uso del Software bioinformático MEGA.</i>	96
9.2.8	<i>Selección de cebadores para estandarizar la metodología de diagnóstico molecular.</i>	97
9.3	<i>Estandarizar la metodología de identificación de P. exigua aislado de semillas de fríjol y forrajes tropicales.</i>	98
9.3.1	<i>Realización de una prueba piloto con hongos aislados de semillas de fríjol y forrajes tropicales para realizar ajustes en la extracción de ADN y en la reacción de PCR.</i>	98
9.3.2	<i>Selección y prueba de la metodología de amplificación de la PCR.</i>	99
9.3.3	<i>Generación del protocolo para la aplicación de la metodología que permita la identificación del hongo cuarentenario P. exigua (B. exigua nov.).</i>	99
10.	<i>Conclusiones</i>	99
11.	<i>Bibliografía</i>	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación de número de artículos hallados en las bases de datos consultadas.....	50
Tabla 2. Nueve secciones de clasificación presente en el género <i>Phoma</i> sp. con sus asociados teleomorfos.	39
Tabla 3. Características morfológicas observadas en <i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i> en medios de cultivo OA, MA y CA.....	54
Tabla 4. Relación de número de secuencias por cada gen hallado.	79
Tabla 4. Criterios generales para la selección de cebadores.	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A).** Identificación morfológica de hongos de tipo cuarentenario en semillas. Observación de estructuras reproductivas en microscopio de luz. **(B).** Estructuras reproductivas del hongo cuarentenario *Curvularia* sp. afectando una semilla del género *Brachiaria* sp., observada bajo microscopio estereoscópico. **(C).** Conidias y conidióforos del hongo *Curvularia* sp., observados en microscopio de luz (40X) Fuente propia.19
- Figura 2. (A - I).** Hongos cuarentenarios asociados a la semilla de fríjol. **(A).** *Macrophomina* sp. **(B).** *Rhizoctonia* sp. **(C).** *Sclerotium* sp. **(D).** *Alternaria* sp. **(E - F).** *Colletotrichum* sp. **(G).** *Phoma* sp. **(H).** *Botrytis* sp. **(I).** *Sclerotinia* sp. Fuente propia.20
- Figura 3. (A - I).** Hongos cuarentenarios asociados a la semilla de forrajes tropicales. **(A).** *Pestalotiopsis* sp. **(B).** *Phomopsis* sp. **(C).** *Rhizoctonia* sp. **(D).** *Phoma* sp. **(E).** *Botrytis* sp. **(F).** *Alternaria* sp. **(G).** *Colletotrichum* sp. **(H).** *Curvularia* sp. **(I).** *Macrophomina* sp. Fuente propia.21
- Figura 4. (A – F).** Sintomatología causada por *P. exigua*. en plantas de fríjol en condiciones de campo. **(A - C).** Fases iniciales de la enfermedad. **(D - F).** Fases avanzadas donde se observa el deterioro del tejido vegetal Fuente propia.....22
- Figura 5. (A – F).** Observaciones de *Phoma* sp. en condiciones de laboratorio. **(A – C).** Picnidios presentes en tejido foliar observados bajo microscopio estereoscópico (400X) **(D).** Picnidio liberando las conidias. **(E).** Conidias liberadas unidas a través del mucilago **(F).** Clamidospora rodeada de conidias Fuente propia.23
- Figura 6. (A-L)** Morfología de picnidios pertenecientes al género *Phoma* sp. hallados afectando semillas y material vegetal en condiciones de laboratorio. Fotografías al estereoscópico tomadas después de 10 días de incubación. **(A, H).** Picnidios presentes en semillas de *Macroptilium gracile*. **(C).** Picnidios infectando semillas de *Alysicarpus vaginalis* **(J).** Picnidios presentes en semillas de *Stylosanthes guianensis*. **(B, E, F, I, K, L).** Semillas pertenecientes al género *Brachiaria* sp. y *Panicum* sp. **(D, G).** Material vegetal de plantas de fríjol recolectado durante los monitoreos fitosanitarios. Fuente propia.....24
- Figura 7.** Morfología de los picnidios hallados afectando las semillas en condiciones de laboratorio. Fotografías al microscopio tomadas después de 10 días de incubación (40X). Fuente propia.25

- Figura 8. (A - L).** Morfología de los conidias unicelulares extraídas de picnidios afectando las semillas en condiciones de laboratorio. **(A).** Material vegetal afectado: *Stylosanthes humilis*. **(B).** *Panicum maximum* **(C).** *Lablab purpureus* **(D, H).** *Stylosanthes guianensis* **(E).** *Calopogonium galactioides*. **(F - I).** **(J).** *Cratyliia argentea* *Phaseolus vulgaris*. **(K).** *Alysicarpus vaginalis* Fotografías al microscopio tomadas después de 10 días de incubación. Fuente propia.26
- Figura 9.** Clamidosporas alatenaroides producidas por *Phoma* sp. en condiciones de laboratorio. Fuente propia.27
- Figura 10.** Conidias producidas por el género *Pithomyces* sp. observadas al microscopio durante los diagnósticos fitosanitarios en semillas de fríjol y forrajes tropicales. Fuente propia.28
- Figura 11.** Conidias producidas por el género *Alternaria* sp. observadas al microscopio durante los diagnósticos fitosanitarios en semillas de fríjol y forrajes tropicales. Fuente propia.28
- Figura 12.** Clamidosporas pseudoparenquimatosas producidas por *Boeremia* sp. en condiciones de laboratorio. Fuente propia.29
- Figura 13.** Clamidosporas producidas por *Macrophomina* sp. en condiciones de laboratorio, presentes en germoplasma de fríjol y forrajes tropicales. Fuente propia.....30
- Figura 14.** Ejemplos de búsquedas realizadas utilizando la herramienta “BLAST” en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) usando secuencias ITS provenientes de aislamientos pertenecientes a *Boeremia* sp. Imágenes tomadas de: (NCBI, 2020).31
- Figura 15.** Rangos de clasificación taxonómica con las respectivas terminaciones utilizadas en la clasificación de los hongos (Hibbett et al., 2007).40
- Figura 16.** Varios tipos de picnidios presentes en el orden Sphaeropsidales. Adaptado de: Alexopoulos et al., 1996.....41
- Figura 17.** Ciclo de vida *Phoma* sp. **1.** Entre 6 – 12 horas después de la infección (hdi), inicia el proceso de germinación conidial con la formación del tubo germinativo y la hifa primaria (peciolos, hojas, tallos, frutos, etc.). **2.** La infección temprana e invasión de tejido, ocurre 24 hdi esta se puede dar a través del tubo germinativo y la hifa primaria por penetración de heridas, estomas abiertos o por la formación de apresorios (los tubos germinales pueden hincharse de 2,5-3,0 µm de diámetro para formar cada apresorio). **3.** 48 hdi se aprecian los primeros síntomas visibles sobre el tejido vegetal infectado. Esto se debe a que hubo penetración de las células de la cutícula y hubo extensión de la infección a través de las células inmediatamente debajo de la cutícula, los tejidos invadidos mueren y

colapsan formando áreas concéntricas deformadas. **4** Aproximadamente a las 96 hdi inicia la producción de las estructuras reproductivas (picnidios) sumergidas en el tejido vegetal infectado **5**. La dispersión de las conidias se produce a través de la salpicadura de agua lluvia, del viento, por contacto con animales, herramientas, etc. (Tran et al., 2016). Imágenes **1-2**: Fuente: (Tran et al., 2016).

Imágenes **3-5**: Fuente propia.....45

Figura 18. *Phoma* sp., Representación esquemática de observaciones al microscopio electrónico sobre la formación del primer conidio (**A-D**). Muestra primero (**A**) la formación de pared papilada de tres capas característica en la célula conidiógena antes de la iniciación del primer conidio; **m** = membrana plasmática. Cuando comienza la nueva construcción de la pared apical del primer conidio (**wc1** en **B**), la capa externa e interna de la papila (**ol** e **il**) se disuelven. La capa media notablemente hinchada (**ml**) parece funcionar como un “abridor” que luego también se disuelve en mucílago. La diferenciación de la pared conidial en una capa interna y externa por la construcción difusa de la pared (**C a y b**; maduración conidial sincrónico con la ontogenia del conidio) se asocia a la producción de una sustancia turbia (**cs**; no se forma igualmente abundantemente en todas las *Phoma* spp.). Junto con el mucílago de la capa intermedia, forma la (s) vaina (s) mucilaginosa alrededor de la primera conidia. Después de la delimitación y separación por una doble pared (**D**) la parte basal de la papila original permanece como un collarate (**col**); a veces, las diferentes capas de la papila (**ol**, **ml**, **il**) todavía son reconocibles en el collarate (**wc2** = pared de la inicial del segundo conidio). Nótese que la capa media de la papila no se observa en el collarate menos conspicuo de la especie tipo de la sección *Pilosa*. Tomado de: (Boerema et al., 2004).48

Figura 19. A-D. Tipos de picnidios. **A.** Regular glabro como en *P. herbarum* **B.** Setoso como en *P. carteri* **C.** Piloso como en *P. betae* **D.** Picnidios similares a picnoesclerocios como en *P. incompta*. Barras de escala = 100 µm. Tomado de: (Aveskamp et al., 2008).54

Figura 20. A-I. Morfología de la clamidospora en *Phoma* sp. **A.** Cadena de clamidosporas de *P. glomerata*. **B.** Clamidosporas alternaroides de *P. glomerata*. **C.** Clamidosporas alternaroides de *P. jolyana*. **D.** Clamidospora botrioides como en *P. sorghina* **E.** Clamidosporas multicelulares unicelulares (**u**) y pseudoesclerotioides (**pm**) en *P. chrysanthemicola*. **F.** Clamidosporas unicelulares de *P. pinodella* **G.** Cadena de clamidosporas unicelulares en *P. clematidina*. **H.** Cadena de clamidosporas unicelulares en *P. chrysanthemicola*. **I.** Clamidosporas epicoccoides en *P. epicoccina*. Barras de escala: A = 100 µm, G = 50 µm, B-F y H-I = 10 µm. Tomado de: (Aveskamp et al., 2008).....55

Figura 21. A-L. Morfología conidial en *Phoma* sp. **A-D.** Conidia hialina, aseptada de pequeño tamaño como en **A.** *P. herbarum* **B.** *P. multirostrata* **C.** *P. astragali* y **D.** *P. eupyrena*. **E-H.** Conidias hialinas, ocasionalmente septadas, de pequeño tamaño como en **E.** *P. exigua* **F.** *P. cucurbitacearum* **G.** *P. macrostoma* y **H.** *P. polemonii*. **I-J.** Las conidias generalmente hialinas de tamaño pequeño, con frecuencia presentan septos grandes, septadas y a menudo pigmentadas, ocurren en **I.** *P. actaeae* y **J.** *P. schneiderae*. **K-L.** Conidia hialina, ocasionalmente septada, pero todas relativamente grandes como en **K.** *P. rabiei* y **L.** *P. xanthina*. Barras de escala = 10 µm. Tomado de: (Aveskamp et al., 2008). ...56

Figura 22. Esquema de *P. exigua* var. *exigua* (Sección *Phyllostictoides*). Corte vertical del picnidio y micelio subsecuente (A). Vista superficial de un ostiolo, revestido internamente con células hialinas papiladas (B). Células conidiogénicas y conidios (C). Representación esquemática de la tabicación secundaria de los conidios. Ocurre como un crecimiento anular hacia el interior de la pared lateral, dejando un poro (p) en el centro. El tabique consta de una laminilla media, la placa septal (sp), a ambos lados cubierta con capas de pared que a cierta distancia están "adheridas" a la pared lateral del conidio. (D-F). Tomado de: (Van der Aa et al., 2000).67

Figura 23. Configuración ostiolar observado en individuos pertenecientes al género *Boeremia* gen. nov. Fuente propia.69

Figura 24. Búsqueda de las secuencias de interés en la base de datos del NCBI.88

Figura 25. Ejemplo de secuencias alineadas y depuradas utilizando el Software MEGA®.90

Figura 26. Árbol filogenético correspondiente al complejo *P. exigua* a partir de alineamientos de secuencias del gen Beta-tubulina.91

Figura 27. Análisis de las secuencias del gen Translation Elongation Factor – TEF para hallar regiones conservadas presentes en secuencias del organismo target (señalas en verde). Un punto (.) en la secuencia representa un nucleótido idéntico con la secuencia consenso.92

1. Introducción

El Programa de Recursos Genéticos (PRG) de la Alianza Internacional Bioversity y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), alberga una de las mayores colecciones de germoplasma a nivel mundial representada en tres cultivos específicos: frijol, forrajes tropicales y yuca. Las sumas de las tres colecciones contienen más de 66.000 accesiones comprendidas en germoplasma en modo de semillas (frijol y forrajes tropicales) y plantas *in vitro* (yuca). Estos tres cultivos hacen parte y sirven como base para el suministro de carbohidratos de proteína vegetal, así como animal en los sistemas agrícolas y alimentarios de la zona tropical, y el mandato de custodia de estos cultivos específicos obedece a la posición geográfica de la Alianza.

Refiriéndose específicamente al material conservado en forma de semilla, se puede decir que la colección de frijol se encuentra representada por 44 taxa, provenientes de 112 países y para el caso de forrajes tropicales se conservan más de 700 especies provenientes de 75 países (CIAT Website, 2019).

Al interior de estas colecciones se pueden encontrar materiales cultivados, así como silvestres, de allí la importancia incalculable de los materiales genéticos conservados. Las accesiones resguardadas en los bancos de germoplasma albergan una enorme capacidad de adaptación, inmersas en sus genes, siendo esta una cualidad invaluable frente a las fluctuaciones climáticas adversas que enfrenta el mundo actualmente. Gracias a los avances biotecnológicos con metodologías cada vez más avanzadas y precisas que permiten conocer mucho más a fondo la expresión de una región génica y sus modelamientos, se hace imprescindible conservar y preservar a largo plazo este tipo de material biológico.

El mantenimiento de estas colecciones involucra tres procesos estrechamente relacionados entre sí: adquisición, conservación y distribución. Actualmente el PRG distribuye cada año entre 5.000 y 6.000 accesiones a usuarios tanto nacionales como internacionales y en respuesta a solicitudes que pueden provenir de entidades públicas y privadas, así como a clientes internos de la Alianza (Cuervo et al., 2016).

El material distribuido y que es recibido posteriormente por los usuarios puede ser usado para ensayos a nivel de campo, fitomejoramiento de especies cultivadas, multiplicación de semilla, actividades de capacitación y entrenamiento o en la conservación misma. El proceso de distribución no representa

ningún costo económico de entrega a la entidad o persona solicitante y se firma bajo un acuerdo de transferencia de material, enmarcado en el Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFAA) y las normas fitosanitarias establecidas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Los objetivos del TIRFAA son la conservación y la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura y la distribución justa y equitativa de los beneficios derivados de su utilización, en armonía con el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD) para una agricultura sostenible y la seguridad alimentaria (FAO, 2009).

La conservación de las colecciones comprende un sinnúmero de actividades en las que se incluyen la regeneración de los materiales en campos de multiplicación, rejuvenecimiento y su almacenamiento final en condiciones controladas de temperatura y humedad. Es importante mencionar que la calidad fitosanitaria y la sanidad están estrechamente relacionadas en cada uno de estos procesos ya que el PRG parte de la premisa que todo material conservado y distribuido debe estar libre de enfermedades y plagas de tipo cuarentenario

El Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (LSG) de la Alianza tiene la responsabilidad de informar sobre el estado fitosanitario del germoplasma que distribuye el PRG y otros programas dentro de la Alianza y de esta manera garantizar que este se encuentre libre de patógenos de tipo cuarentenario, es decir, aquellos que tengan la capacidad de ser transmitidos a través de la semilla (fríjol y forrajes tropicales) (Cuervo et al., 2016).

Dentro de las actividades propias del LSG está la de monitorear fitosanitariamente los diferentes campos de regeneración de semilla, así como los invernaderos y casas de malla. Esto con el fin de hacer detección temprana de enfermedades causadas por hongos, virus o bacterias en condiciones de campo y de esta manera evitar que aquellos patógenos que pudiesen estar presentes en las plantas, lleguen hasta la semilla (Varón, 2020).

Uno de los factores que afecta directamente la producción de semilla son las enfermedades causadas por hongos, especialmente los de tipo cuarentenario ya que afectan directamente los procesos de distribución, aumentando los costos de producción. Cuando una accesión (germoplasma conservado en forma de semilla) al ser evaluada por el LSG resulta con presencia de hongos de tipo cuarentenario,

su cosecha deberá ser eliminada y el proceso de regeneración deberá iniciar nuevamente tomando las medidas de control correspondientes al patógeno hallado.

Esto quiere decir que toda accesión con presencia de hongos de tipo cuarentenario será rechazada fitosanitariamente, quedando restringida su distribución hasta obtener semilla sanitariamente aceptada, es decir, sin presencia de agentes patógenos (Cuervo et al., 2016).

Actualmente el LSG realiza la evaluación de presencia de hongos de tipo cuarentenario mediante el uso de técnicas biológicas tales como el método de cámara húmeda o Blotter test y agar plato o Agar test; aprobados por la Asociación Internacional para la Evaluación de Semillas (ISTA, por sus siglas en inglés) (Rao et al., 2006) y claves taxonómicas tales como la de Ellis, 1976; Nelson et al., 1983; Hanlin, 1990; Hanlin, 1998; y Barnett & Hunter 1998.

Dentro de sus actividades rutinarias de diagnóstico el LSG realiza la detección de 33 hongos de tipo cuarentenario, procesando anualmente entre 7.000 y 8.000 muestras, comprendidas entre germoplasma en forma de semilla proveniente del banco de germoplasma y material vegetal (hojas, tallos y raíces) provenientes, de la recolección de muestras en condiciones de campo e invernadero de los materiales que se encuentran en fase de regeneración (Genebank Platform, 2021).

Para el diagnóstico de hongos de tipo cuarentenario asociados a semillas de frijol y forrajes tropicales el Laboratorio de Sanidad cuenta con personal profesional altamente calificado con más de 15 años de experiencia en el campo de la identificación taxonómica basada en caracteres morfológicos. Debido al alto volumen de muestras procesadas anualmente, es de vital importancia contar con personal con un alto nivel de experticia en este campo de la fitopatología, debido a la complejidad que refiere esta metodología de diagnóstico rutinario.

De acuerdo a lo anterior es importante mencionar que la principal fuente de rechazo fitosanitario son los hongos, generando un fuerte impacto en la distribución segura del germoplasma; afectando procesos de seguridad alimentaria, investigación y conservación. Aproximadamente el 5% del germoplasma evaluado anualmente por el LSG es rechazado fitosanitariamente por este tipo de agentes patógenos.

Basándose en los resultados de las evaluaciones fitosanitarias realizadas por el LSG es posible identificar la presencia de un grupo de hongos cuarentenarios altamente recurrentes, entre los que se

encuentran los géneros: *Curvularia* sp., *Phomopsis* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., y *Phoma* sp.

Dentro del grupo de hongos cuarentenarios que limitan la distribución del germoplasma se encuentra reportada a nivel nacional la especie *Phoma exigua*. Este hongo ha sido hallado durante los monitoreos fitosanitarios realizados por el laboratorio; en los diferentes campos de regeneración de semilla afectando el tejido foliar y caulinar y la sintomatología asociada a este patógeno ha sido identificada tanto en las parcelas de fríjol como de forrajes tropicales (Jara & Cotes, 2016).

Adicionalmente, en condiciones de laboratorio es común observar gran cantidad de estructuras reproductivas asociadas a esta especie, sobre muestras de tejido vegetal recolectado en campo, así como en los diagnósticos fitosanitarios realizados a las semillas.

En los diagnósticos realizados por el LSG durante los últimos cinco años *P. exigua* se encuentra ubicado dentro del grupo de los cinco hongos más recurrentes causantes del rechazo fitosanitario junto con algunos de los géneros anteriormente mencionados.

Dentro del género *Phoma* sp. existen especies que no son cuarentenarias para las colecciones en custodia. Sin embargo, desde el punto de vista estrictamente morfológico y debido a la similitud de sus estructuras reproductivas (picnidios y conidias unicelulares) con otros individuos pertenecientes a este género, así como a individuos pertenecientes a géneros morfológicamente similares; en muchos casos es una labor bastante compleja realizar un diagnóstico preciso que permita llegar hasta nivel de especie.

Actualmente el LSG cuenta con una robusta base de datos con más de 5000 imágenes, dentro de las cuales es posible apreciar de manera detallada la presencia de picnidios hallados en las evaluaciones. Este tipo de estructuras ha sido observado en el material vegetal que ha sido incubado bajo condiciones controladas de luz y temperatura, durante un periodo de 10 días aproximadamente. Con base en las evaluaciones realizadas es posible observar la gran variedad de morfologías picnidiales presentes en el germoplasma en custodia evaluado (semillas y material vegetal proveniente de campo).

Adicional a las fotografías de las conformaciones picnidiales, el laboratorio cuenta con imágenes tomadas usando microscopio de luz, de conidias extraídas de los picnidios hallados durante el proceso de diagnóstico fitosanitario.

Debido a la gran similitud en la morfología picnidial y conidial observadas durante las evaluaciones, el LSG actualmente rechaza fitosanitariamente todo material que presente picnidios y conidias morfológicamente similares a los producidos por la especie *P. exigua*. Esto con el fin de impedir la propagación de este patógeno a través del proceso de distribución del germoplasma y de esta manera evitar la proliferación de enfermedades a zonas geográficas donde no se encuentre esta especie en particular.

Esto representa serias implicaciones ya que la cosecha producida por la accesión fitosanitariamente rechazada debe ser eliminada, afectando el cumplimiento de metas en cuanto a cantidad de semilla disponible para conservación y distribución. Esto significa que en el rechazo fitosanitario de una accesión se incurre en pérdidas económicas durante los procesos de producción y beneficio de la semilla (Rao et al., 2006).

Como consecuencia del rechazo fitosanitario, actualmente hay un sobrecosto en los procesos de regeneración de semillas para las dos colecciones en custodia, debido a que la accesión rechazada deberá iniciar nuevamente el proceso de establecimiento y multiplicación en condiciones de invernadero y campo, siempre y cuando las condiciones de siembra seas las favorables. Es importante mencionar que, según la especie a regenerar, la obtención de semilla puede representar periodos bastante amplios de establecimiento del cultivo en condiciones de campo, principalmente cuando se trata de especies silvestres.

Adicionalmente, debido a su condición fitosanitaria aquellas accesiones que han sido rechazadas deben ser retenidas por el área de conservación en cumplimiento con las normas nacionales e internacionales de transporte seguro de germoplasma y por lo tanto no estarán disponibles para su distribución, afectando los procesos de seguridad alimentaria e investigación (Smale & Jamora, 2020).

Con base en el gran desafío que representa desde el punto de vista morfológico el identificar taxonómicamente especies no cuarentenarias similares a *P. exigua*, se hace imprescindible para el LSG, la necesidad de desarrollar pruebas de diagnóstico confirmatorias; mediante el uso de técnicas moleculares que complementen las técnicas de identificación utilizadas en la actualidad.

Con el presente documento se busca mostrar un panorama amplio de los métodos y principios utilizados en la clasificación taxonómica del hongo *Phoma exigua*, presentar las metodologías de identificación más relevantes, resaltando las ventajas y desventajas en los procesos de diagnóstico.

Adicional a esto, describir la complejidad que envuelve el diagnóstico del género *Phoma* sp. y la especie *P. exigua* como resultado de las ambigüedades presentes en las diferentes metodologías basadas en la morfología; las cuales han dificultado considerablemente el trabajo de identificación fitosanitario a través de los años. Posteriormente, cuando hayan sido identificadas las debilidades en las metodologías de identificación usadas a lo largo de la historia, es importante evidenciar las ventajas de desarrollar una metodología de diagnóstico molecular del hongo cuarentenario *Phoma exigua* en fríjol y forrajes tropicales, debido a la alta sensibilidad y especificidad de este tipo de técnicas. Finalmente, es importante ilustrar cuál sería el flujo de trabajo, que introduzca a los laboratorios de sanidad vegetal, en el camino hacia la implementación y uso de metodologías de diagnóstico mucho más sensibles y eficientes y de esta manera estar a la vanguardia en el campo del diagnóstico fitosanitario.

2. Marco teórico

2.1 Hacia el interior del diagnóstico fitosanitario: Laboratorio de Sanidad de Germoplasma

El laboratorio de Sanidad de Germoplasma de la Alianza creado hace más de 30 años, cuenta con un grupo de trabajo conformado con personal profesional de alta calidad, responsable del monitoreo, diagnóstico y aseguramiento de la calidad sanitaria de las colecciones en custodia. Este grupo multidisciplinario cuenta un portafolio de metodologías estandarizadas de diagnóstico (biológicas, serológicas y moleculares) de alta calidad, con el fin de identificar la presencia o ausencia de agentes patógenos (hongos, virus, bacterias y fitoplasmas) presentes en el material vegetal conservado y de esta manera garantizar que el germoplasma que conserva y distribuye el PRG se encuentre libre de patógenos y plagas de tipo cuarentenario (Pineda, 2017).

Dentro de los objetivos principales del LSG se encuentra el desarrollo e implementación de metodologías de diagnóstico altamente sensibles que faciliten la rápida y correcta identificación de aquellos agentes patógenos que puedan ser transmitidos a través de la semilla (fríjol y forrajes tropicales).

Actualmente el laboratorio cuenta con un sistema de gestión de calidad basado en los criterios de la Norma Internacional ISO 17025, que garantiza la trazabilidad y una alta calidad de los resultados

obtenidos en las diferentes pruebas de diagnóstico realizadas. El laboratorio cuenta, además, con un sistema de documentación bastante robusto, soportado por aplicaciones digitales que facilitan el proceso de registro y almacenamiento de la información en las diferentes bases de datos. Adicionalmente el LSG cuenta con material de referencia tanto en hongos como en bacterias que garantizan la confiabilidad de las evaluaciones realizadas (Pineda, 2019).

Gracias a la implementación del sistema de calidad; a una infraestructura adecuada y a la idoneidad del grupo de trabajo, el LSG cuenta actualmente con el registro como laboratorio reconocido de diagnóstico fitosanitario, mediante resolución emitida por el Gobierno de Colombia, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (Cuervo et al., 2019).

Contar con este registro significa que todas las pruebas de diagnóstico fitosanitario llevadas a cabo dentro de las instalaciones del LSG, son reconocidas y avaladas por el ICA como requisito para los procesos de importación y exportación de germoplasma. Cabe aclarar que el registro otorgado abarca pruebas de diagnóstico de patógenos presentes en los cultivos de frijón, forrajes tropicales y yuca.

En este orden de ideas el laboratorio de sanidad de germoplasma tiene dentro de sus responsabilidades el diagnóstico de hongos patógenos que pudiesen llegar a afectar el germoplasma conservado en forma de semilla. Para tal fin se utilizan las metodologías establecidas por el ISTA, las cuales se basan en el uso de las técnicas denominadas como cámara húmeda o Blotter test y plato agar (Rao et al., 2006).

La identificación de los hongos hallados se lleva a cabo mediante taxonomía básica y técnicas moleculares a través de uso de cebadores universales. Es importante enfatizar que un laboratorio de diagnóstico fitosanitario debe contar con personal profesional altamente entrenado y con la experiencia requerida en el uso de claves dicotómicas y un correcto reconocimiento de los diferentes caracteres morfológicos presentes en los hongos (Fig. 1).

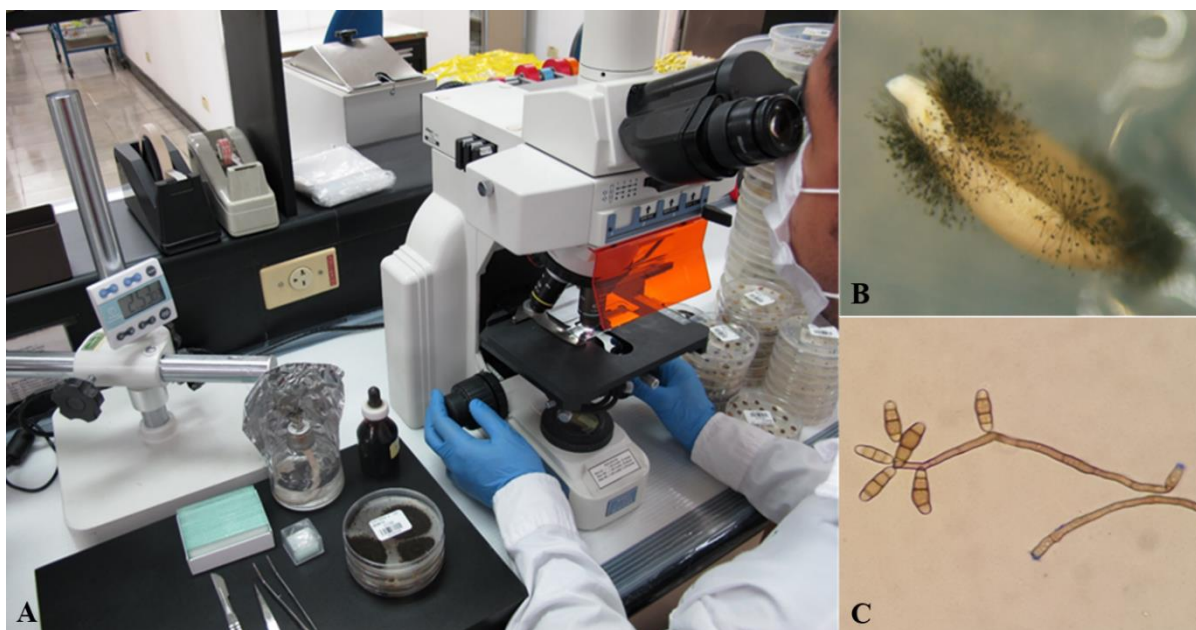


Figura 1. A). Identificación morfológica de hongos de tipo cuarentenario en semillas. Observación de estructuras reproductivas en microscopio de luz. **(B).** Estructuras reproductivas del hongo cuarentenario *Curvularia* sp. afectando una semilla del género *Brachiaria* sp., observada bajo microscopio estereoscópico. **(C).** Conidias y conidióforos del hongo *Curvularia* sp., observados en microscopio de luz (40X) Fuente propia.

Como se mencionó anteriormente, el LSG cuenta con un base de datos con imágenes de germoplasma afectado por hongos, así como estructuras reproductivas de los mismos. Estas imágenes han sido obtenidas durante las evaluaciones realizadas a las semillas en condiciones de laboratorio, así como del material vegetal con presencia de síntomas en condiciones de campo. En las figuras 2-3 se puede apreciar germoplasma perteneciente a los cultivos de fríjol y forrajes tropicales con presencia de una variedad de estructuras reproductivas producidas por hongos cuarentenarios afectando el material. Normalmente este tipo de estructuras se pueden observar tras un periodo de incubación de 10 días aproximadamente, en condiciones de luminosidad y temperatura controladas.

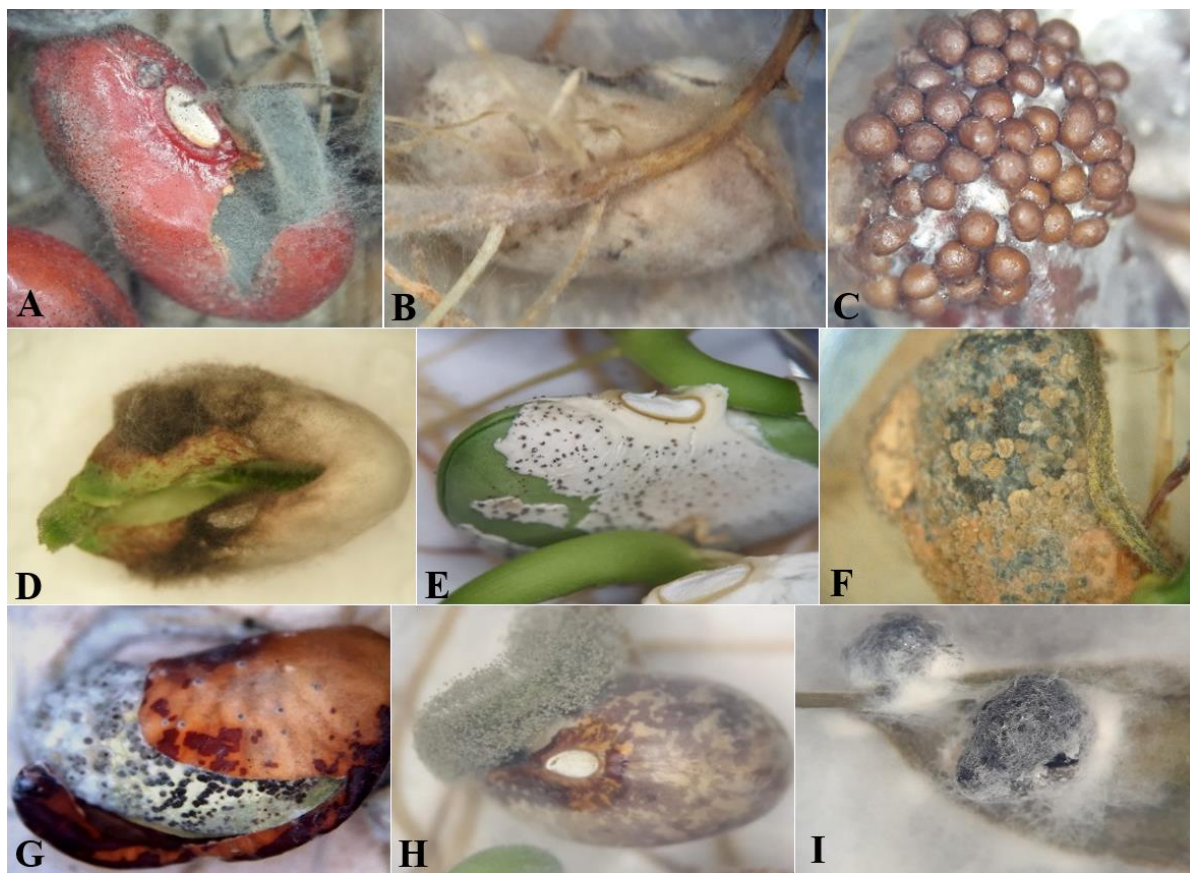


Figura 2. (A - I). Hongos cuarentenarios asociados a la semilla de fríjol. (A). *Macrophomina* sp. (B). *Rhizoctonia* sp. (C). *Sclerotium* sp. (D). *Alternaria* sp. (E - F). *Colletotrichum* sp. (G). *Phoma* sp. (H). *Botrytis* sp. (I). *Sclerotinia* sp. Fuente propia.

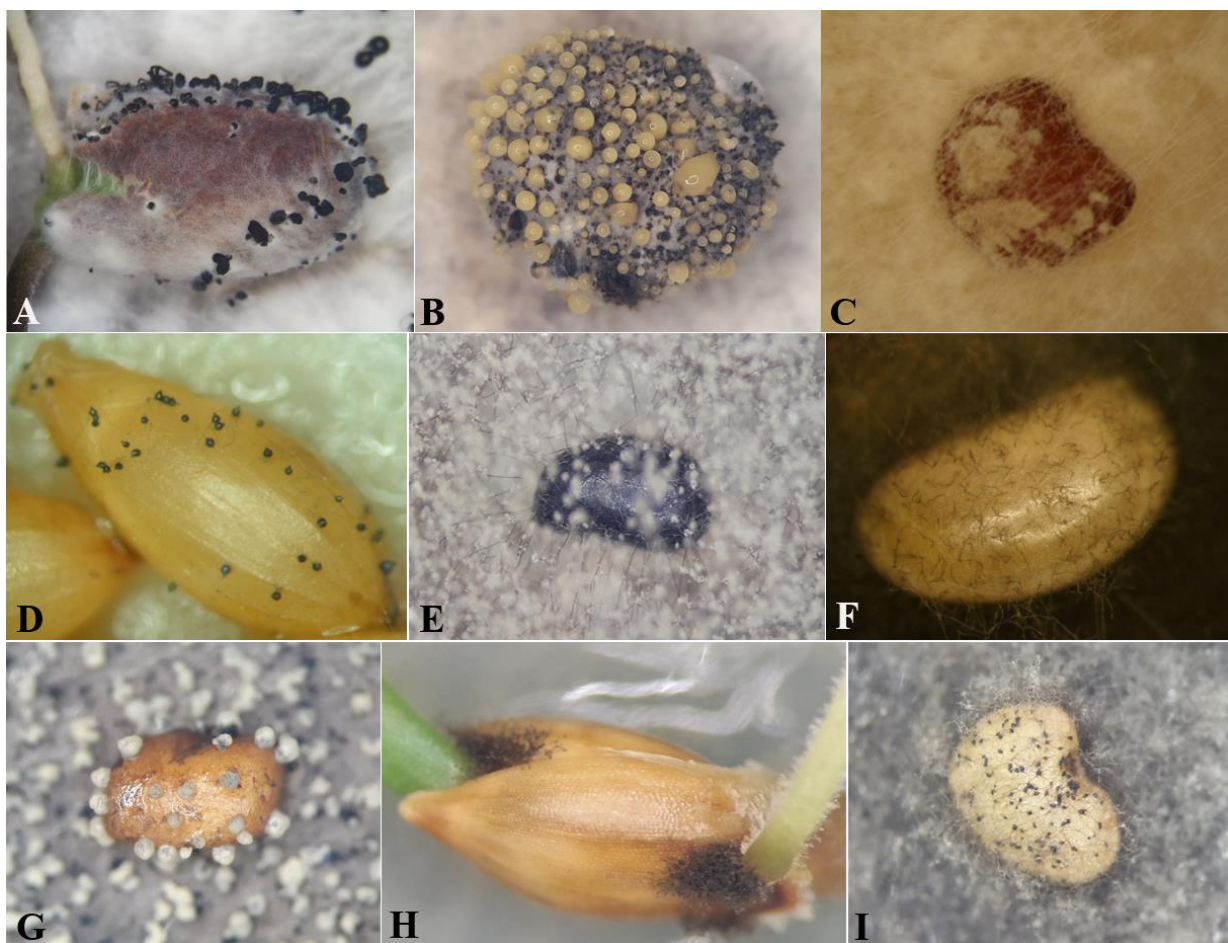


Figura 3. (A - I). Hongos cuarentenarios asociados a la semilla de forrajes tropicales. (A). *Pestalotiopsis* sp. (B). *Phomopsis* sp. (C). *Rhizoctonia* sp. (D). *Phoma* sp. (E). *Botrytis* sp. (F). *Alternaria* sp. (G). *Colletotrichum* sp. (H). *Curvularia* sp. (I). *Macrophomina* sp. Fuente propia.

Dentro de las actividades del LSG se encuentra la de realizar monitoreos fitosanitarios de las accesiones sembradas en condiciones de campo e invernadero. Durante los recorridos a los diferentes campos de multiplicación de semilla, es posible observar la presencia de síntomas característicos producidos por el hongo *P. exigua* afectando el material vegetal, principalmente en el tejido foliar y en casos aislados sobre frutos y tallos (Fig. 4).

De acuerdo a la literatura, los síntomas producidos por el ataque de *P. exigua* se caracterizan por formar anillos concéntricos (Fig. 4A), los cuales pueden observarse distribuidos de manera irregular principalmente en el tejido foliar (Colmán et al., 2020), reduciendo la capacidad fotosintética de las plantas y de esta manera afectado la producción de semillas. Los síntomas pueden ser observados por

lo general sobre el tejido foliar, sin embargo, en casos aislados es posible hallar vainas con deterioro del tejido, iniciando la infección cerca del peciolo.



Figura 4. (A – F). Sintomatología causada por *P. exigua*. en plantas de fríjol en condiciones de campo. (A - C). Fases iniciales de la enfermedad. (D - F). Fases avanzadas donde se observa el deterioro del tejido vegetal Fuente propia.

Aquellas accesiones con presencia de síntomas, se recolectan y se lleva a las instalaciones del LSG con el fin de confirmar mediante el diagnóstico fitosanitario la presencia del hongo *P. exigua*. Ya en el laboratorio el material vegetal es desinfectado y puesto en incubación por un periodo de 10 días

aproximadamente ya sea en Blotter test o Agar test. Finalizado el periodo de incubación es posible observar la presencia de fructificaciones tal y como se muestra en la figura 5.

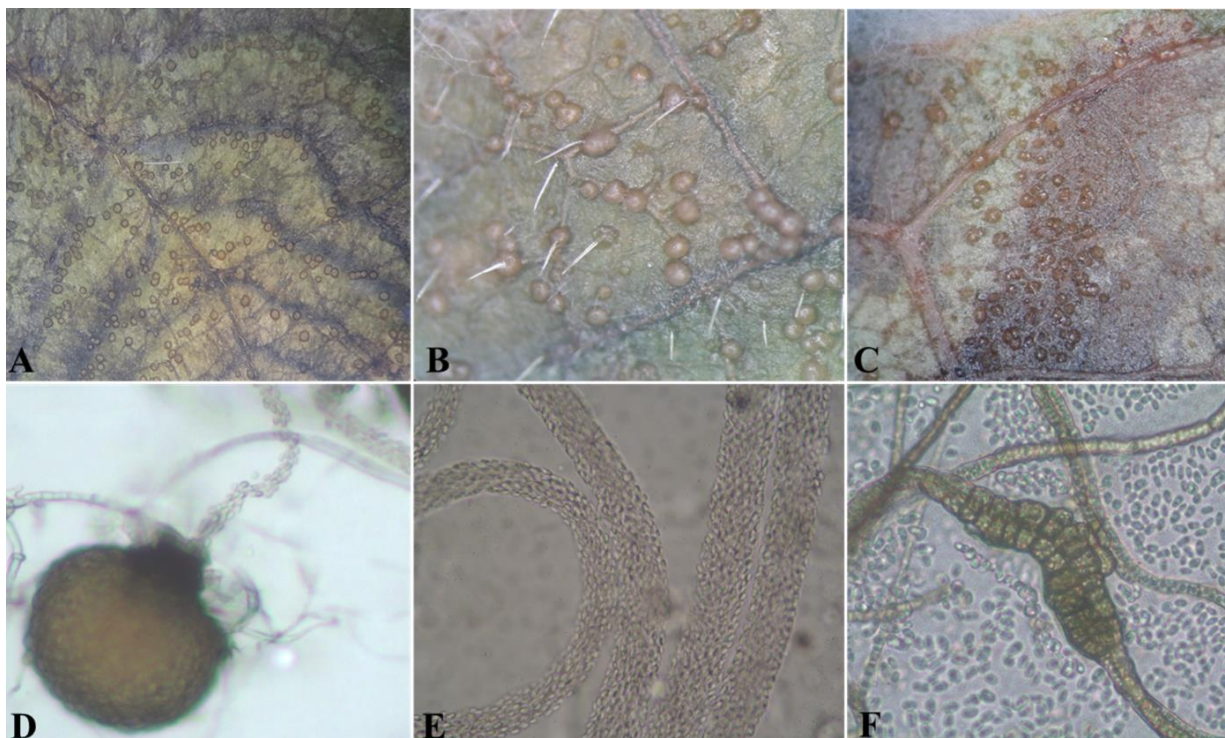


Figura 5. (A – F). Observaciones de *Phoma* sp. en condiciones de laboratorio. (A – C). Picnidios presentes en tejido foliar observados bajo microscopio estereoscópico (400X) (D). Picnidio liberando las conidias. (E). Conidias liberadas unidas a través del mucilago (F). Clamidospora rodeada de conidias. Fuente propia.

Una de las grandes limitaciones dentro de las actividades de diagnóstico del hongo *P. exigua* hasta nivel de especie, es la gran similitud en la morfología de sus estructuras reproductivas con individuos pertenecientes al mismo género u otros géneros emparentados. En las evaluaciones es muy común encontrarse con una amplia variedad de conformaciones picnidiales que pueden dificultar el diagnóstico basado únicamente en caracteres taxonómicos y es importante mencionar, que dependiendo del hospedero, algunas características morfológicas de los hongos pueden variar, generando interpretaciones incorrectas al momento de la identificación. Un claro ejemplo de esto se puede apreciar en la figura 6, en la cual se muestra la presencia de picnidios de individuos pertenecientes al género *Phoma* sp. afectando diferentes hospederos en varios tipos de tejido.

Adicionalmente, se muestran algunas imágenes de la morfología de los picnidios hallados observados bajo microscopio de luz (Fig. 7).

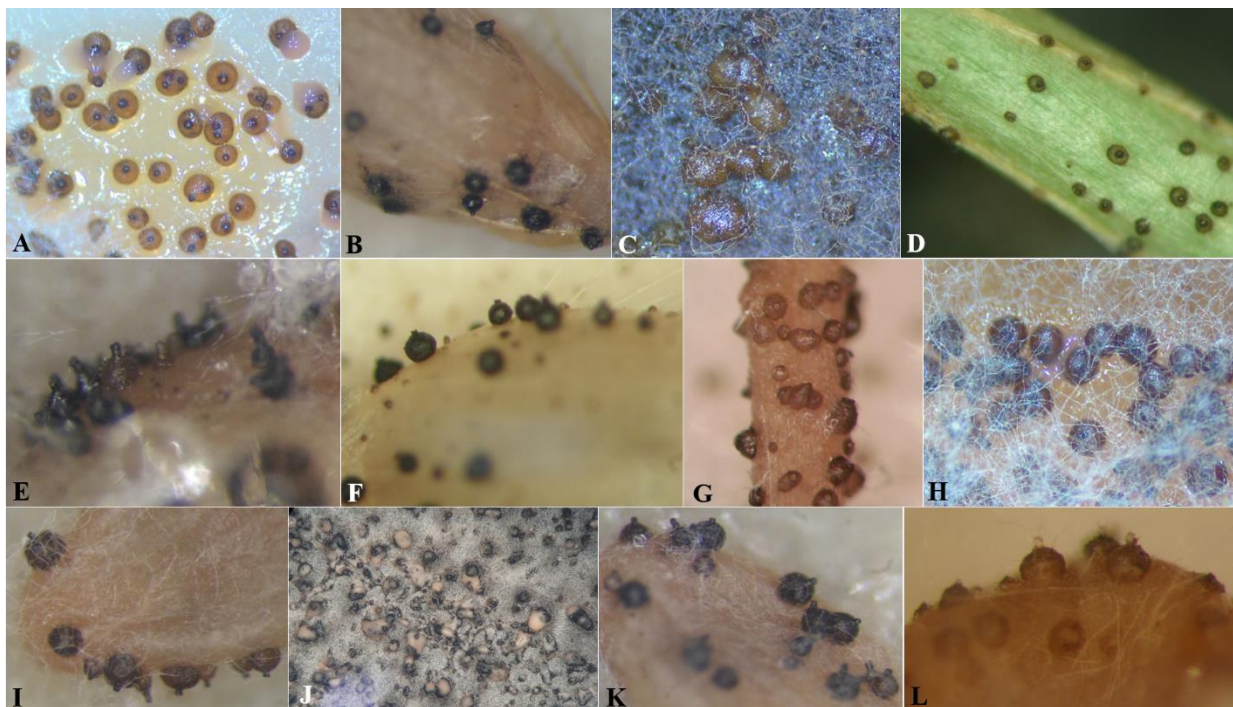


Figura 6. (A-L) Morfología de picnidios pertenecientes al género *Phoma* sp. hallados afectando semillas y material vegetal en condiciones de laboratorio. Fotografías al estereoscopio tomadas después de 10 días de incubación. (A, H). Picnidios presentes en semillas de *Macrottilium gracile*. (C). Picnidios infectando semillas de *Alysicarpus vaginalis* (J). Picnidios presentes en semillas de *Stylosanthes guianensis*. (B, E, F, I, K, L). Semillas pertenecientes al género *Brachiaria* sp. y *Panicum* sp. (D, G). Material vegetal de plantas de fríjol recolectado durante los monitoreos fitosanitarios. Fuente propia.

Si al momento del diagnóstico el personal encargado de la evaluación se encuentra con este tipo de estructuras, se debe realizar un montaje en el microscopio con el fin de confirmar la presencia de conidias hialinas unicelulares las cuales son el principal carácter taxonómico de este patógeno en particular. Ejemplo de esto se puede apreciar en la figura 8, donde claramente es posible observar la presencia de este tipo de conidias en los montajes realizados, sin embargo, se pueden ver claramente las diferentes dimensiones conidiales, lo que indica que, a pesar de la similaridad de estas estructuras,

existe la posibilidad de que nos encontremos con la presencia de especies diferentes a *P. exigua* e incluso individuos pertenecientes a especies estrechamente emparentadas con el género.

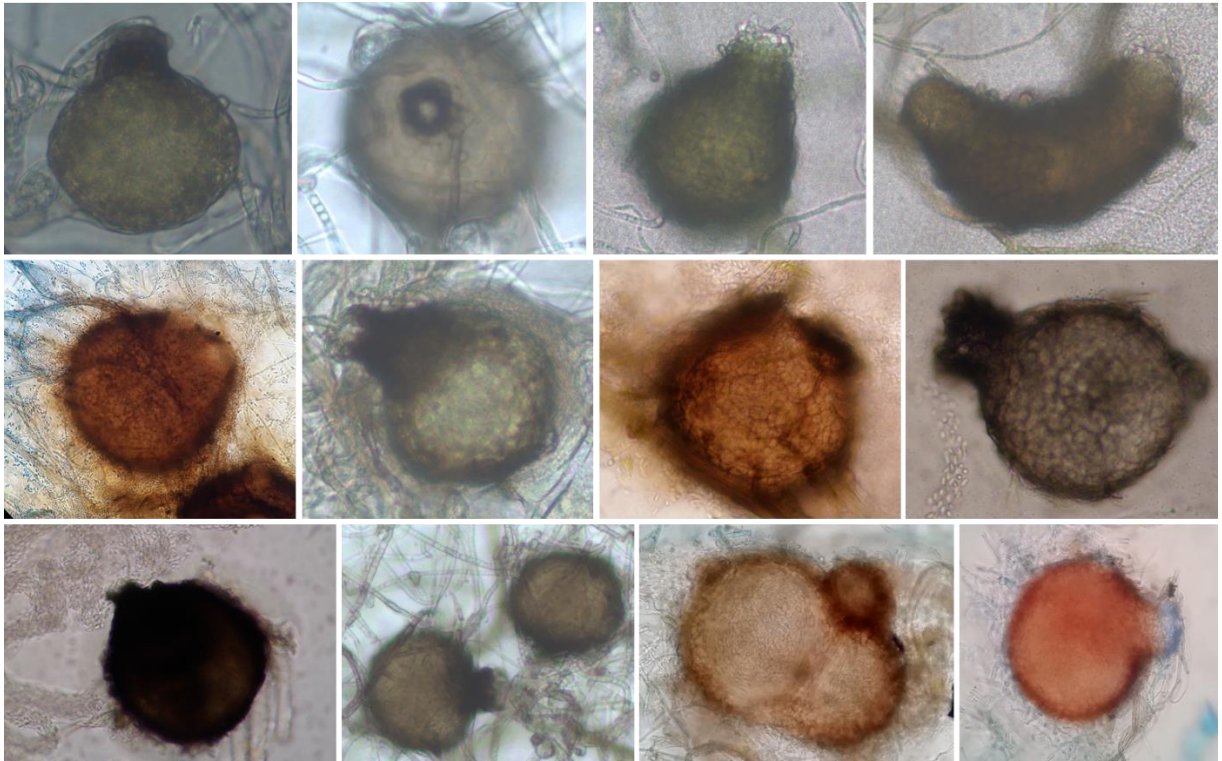


Figura 7. Morfología de los picnidios hallados afectando las semillas en condiciones de laboratorio. Fotografías al microscopio tomadas después de 10 días de incubación (40X). Fuente propia.

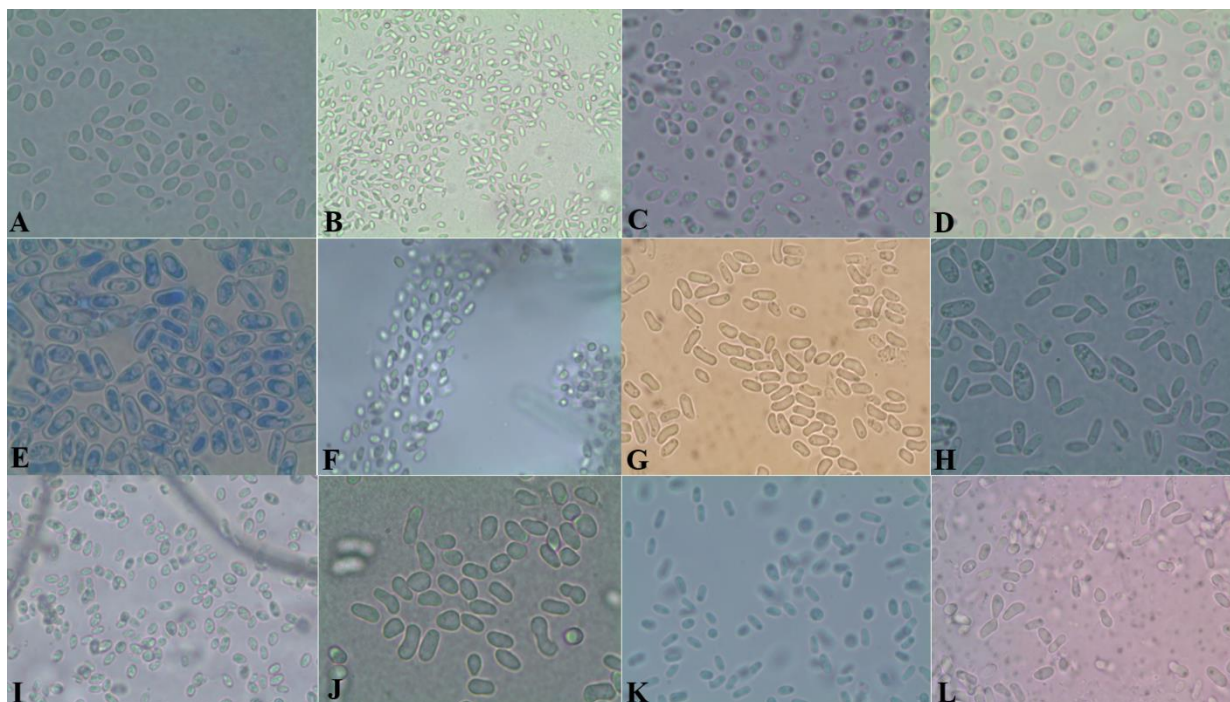


Figura 8. (A - L). Morfología de los conidias unicelulares extraídas de picnidios afectando las semillas en condiciones de laboratorio. **(A).** Material vegetal afectado: *Stylosanthes humilis*. **(B).** *Panicum maximum* **(C).** *Lablab purpureus* **(D, H).** *Stylosanthes guianensis* **(E).** *Calopogonium galactioides*. **(F - I).** **(J).** *Cratylia argentea Phaseolus vulgaris*. **(K).** *Alysicarpus vaginalis* Fotografías al microscopio tomadas después de 10 días de incubación. Fuente propia.

2.2 Limitaciones durante la identificación de caracteres morfológicos

Después de haber realizado un tamizaje por las diferentes metodologías usadas para el diagnóstico o revelación filogenética del complejo *Phoma* y sus parientes cercanos, es posible aseverar que herramientas moleculares tan eficientes como la tipificación de secuencias multilocus (MLTS, por sus siglas en inglés) ayudan a los micólogos y fitopatólogos a esclarecer preguntas acerca de las delimitaciones y lineamientos de las especies basándose principalmente en evidencias genéticas.

A continuación, se expondrán algunas limitaciones experimentadas al momento de realizar diagnósticos basándose en caracteres morfológicos. Esto con el fin de ejemplificar de manera gráfica a los retos que se ven enfrentados los fitopatólogos en condiciones de laboratorio, haciéndose evidente

el desarrollo de metodologías moleculares complementarias confirmatorias y de esta manera facilitar las evaluaciones fitosanitarias.

En el campo de la taxonomía tradicional una de las situaciones más comunes al momento de realizar diagnósticos en condiciones de laboratorio es la identificación de clamidosporas alternaroides (estructuras de resistencia) (Fig. 9) producidas por *Phoma* sp. Si no se cuenta con la experiencia requerida para el reconocimiento de este tipo de estructuras, es posible llegar a confundirlas con conidias producidas por hongos pertenecientes a los géneros *Pithomyces* sp. (Fig. 10). y *Alternaria* sp. (Fig. 11). En estas imágenes se puede apreciar claramente la gran similitud de estas estructuras de resistencia con los géneros anteriormente relacionados.

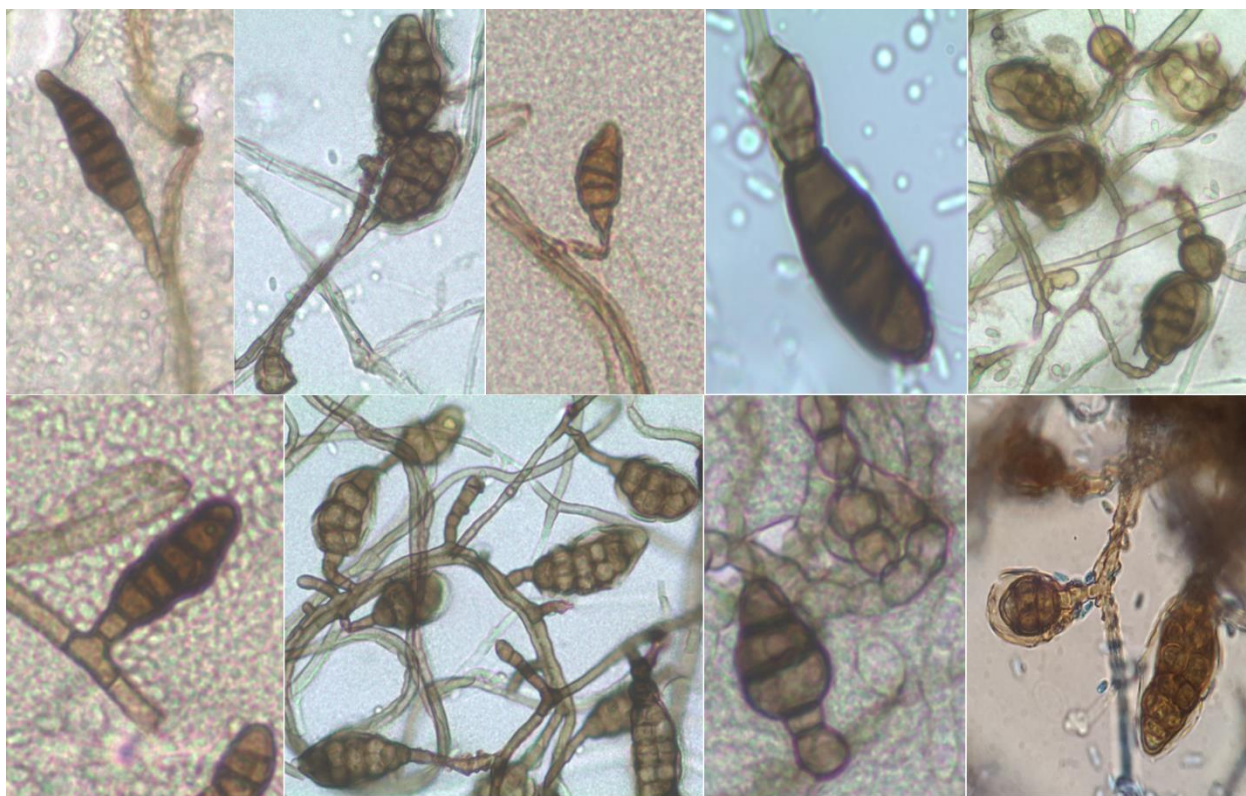


Figura 9. Clamidosporas alternaroides producidas por *Phoma* sp. en condiciones de laboratorio.
Fuente propia.



Figura 10. Conidias producidas por el género *Pithomyces* sp. observadas al microscopio durante los diagnósticos fitosanitarios en semillas de fríjol y forrajes tropicales. Fuente propia.

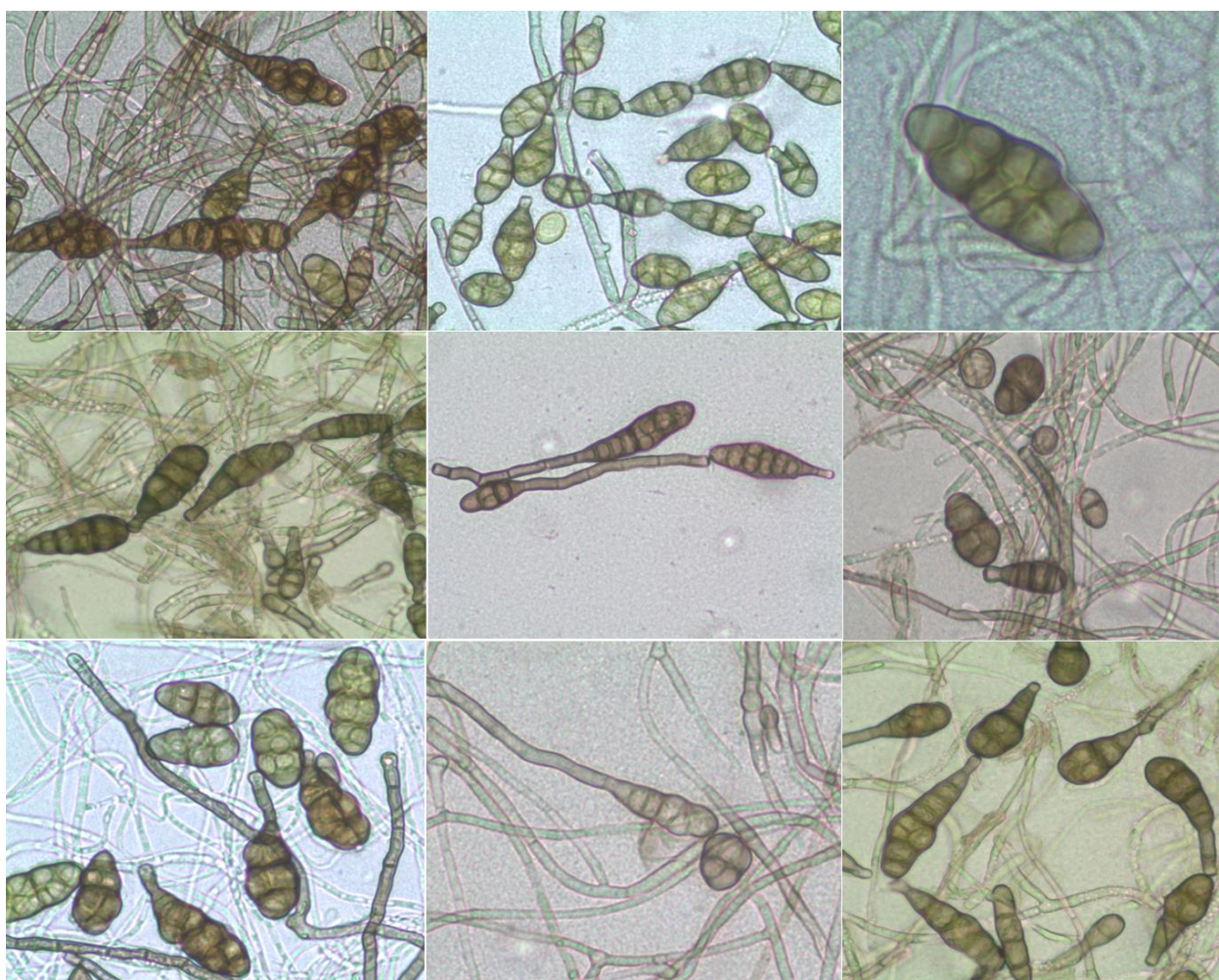


Figura 11. Conidias producidas por el género *Alternaria* sp. observadas al microscopio durante los diagnósticos fitosanitarios en semillas de fríjol y forrajes tropicales. Fuente propia.

Es importante mencionar que, aunque los picnidios son uno de los principales caracteres taxonómicos para la identificación del género *Phoma* sp., durante las evaluaciones en condiciones de laboratorio algunas cepas solo producen micelio, acompañado de clamidosporas pseudoesclerotioides (Fig. 12), generando posibles equivocaciones en el diagnóstico al confundirlas con las producidas por el género *Macrophomina* sp. (Fig. 13), el cual es muy común encontrar en el germoplasma de fríjol y forrajes tropicales.

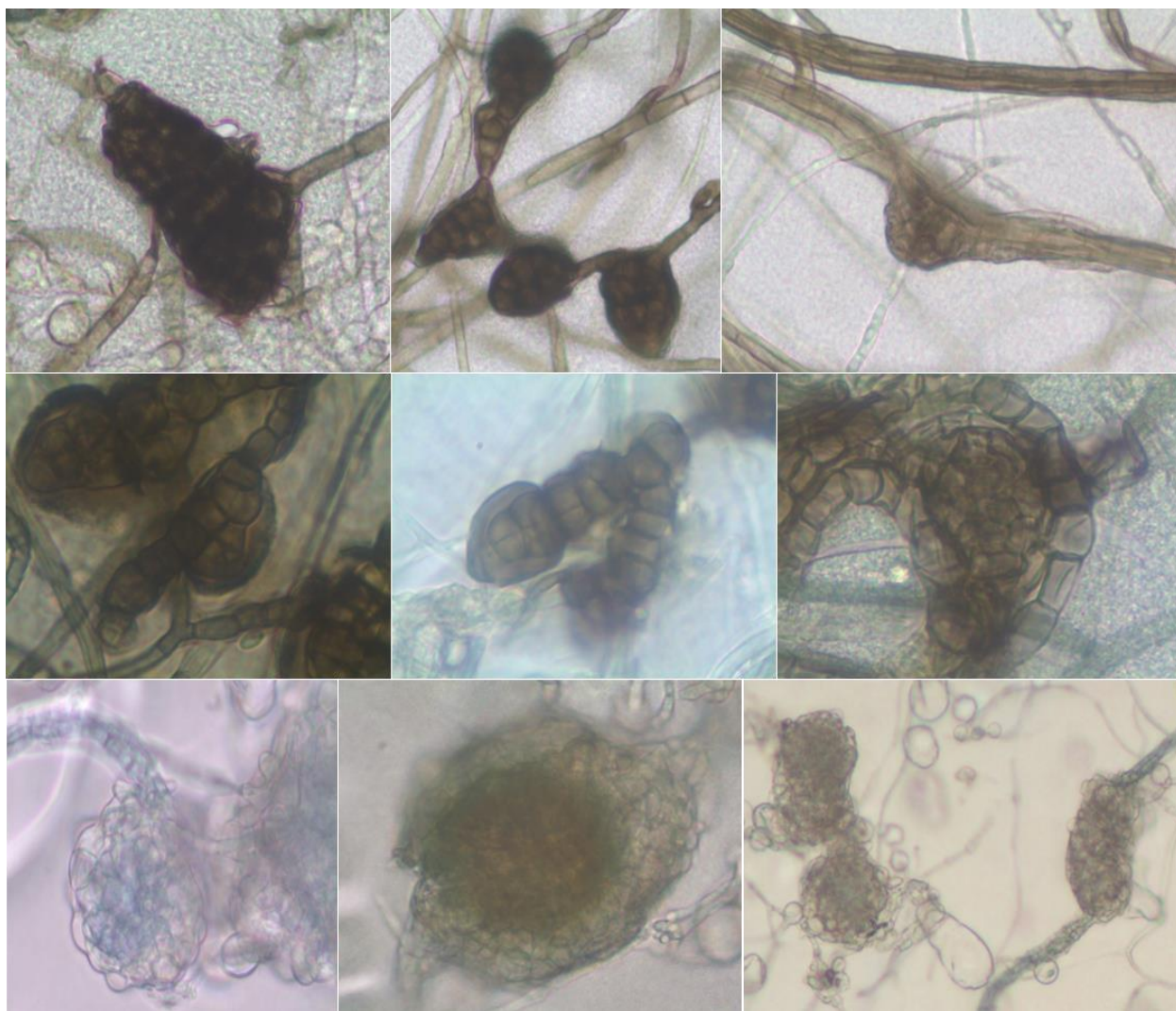


Figura 12. Clamidosporas pseudoparenquimatosas producidas por *Phoma* sp. en condiciones de laboratorio. Fuente propia.

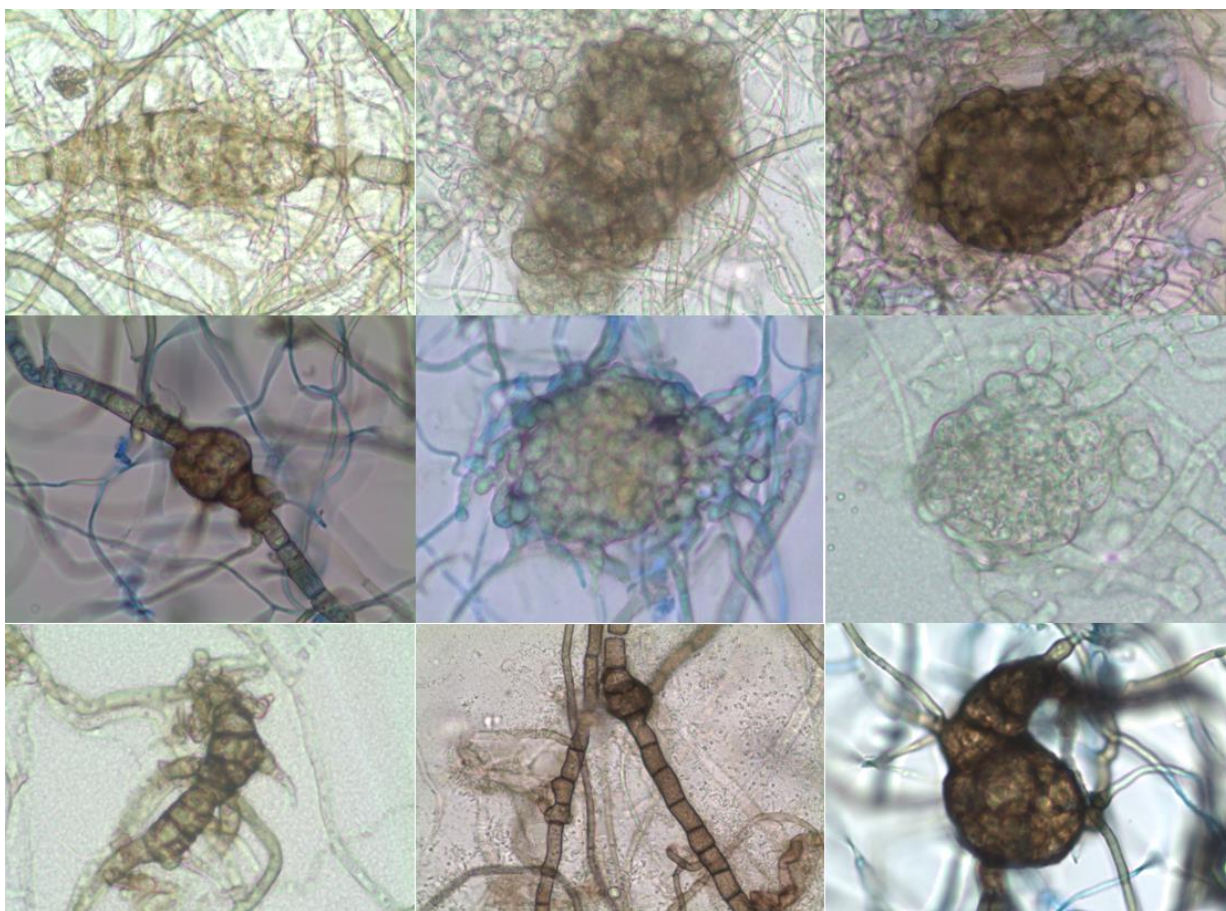


Figura 13. Clamidosporas producidas por *Macrophomina* sp. en condiciones de laboratorio, presentes en germoplasma de fríjol y forrajes tropicales. Fuente propia.

Adicionalmente dentro de las actividades rutinarias en el LSG se han llevado a cabo extracciones de ADN a modo de ensayo de pruebas confirmatorias, usando colonias que han sido identificadas morfológicamente como *Phoma exigua*. Posteriormente se han realizado Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) convencionales, utilizando cebadores universales con el fin de obtener amplificaciones de la región de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS, por sus siglas en inglés). Las secuencias obtenidas han sido comparadas en bases de datos de nucleótidos, usando la herramienta bioinformática BLAST®.

Otro de los problemas que se presenta en el campo de la taxonomía de los hongos es que aun haciendo uso de herramientas moleculares las cuales son más sensibles comparadas con diagnósticos morfológicos, es posible encontrarse con ciertas inconsistencias al momento de recurrir a las bases de

datos públicas. En la figura 14 se pueden apreciar ejemplos de varias comparaciones usando secuencias de la región ITS, de las colonias anteriormente mencionadas y se observa claramente como hacen correspondencia de más del 95% con secuencias de hongos morfológicamente distintas a *Phoma* sp., por ejemplo, con individuos pertenecientes a los géneros *Epicoccum* sp., *Cochliobolus* sp., *Leptosphaerulina* sp., entre otros.

The figure displays three examples of BLAST search results. Each example includes a job title, nucleotide sequence, and a list of top hits with their respective statistics.

Example 1 (Top): Job Title: Nucleotide Sequence. RID: W271GSHZ016. Program: BLASTN. Database: nt. Query ID: Ict|Query_39149. Description: None. Molecule type: dna. Query Length: 514. Other reports: Distance tree of results, MSA viewer. Filter Results: Organism (exclude), Percent Identity (to), E value (to), Query Coverage (to). Filter, Reset.

Organism	Percent Identity	E value	Query Coverage
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Cochliobolus kusanoi</i> strain CS11675 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int...	878	93%	0.0 99.58%
<input type="checkbox"/> <i>Phoma herbarum</i> isolate marine internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comp...	874	93%	0.0 99.38%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> isolate 4BLW1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c...	874	93%	0.0 99.17%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Epicoccum sorghinum</i> isolate Guanoxi-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ...	872	93%	0.0 99.38%

Example 2 (Middle): Job Title: Nucleotide Sequence. RID: W2750HZ5013. Program: BLASTN. Database: nt. Query ID: Ict|Query_36993. Description: None. Molecule type: dna. Query Length: 520. Other reports: Distance tree of results, MSA viewer. Filter Results: Organism (exclude), Percent Identity (to), E value (to), Query Coverage (to). Filter, Reset.

Organism	Percent Identity	E value	Query Coverage
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Epicoccum nigrum</i> strain K36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S riboso... <i>Epicoccum nigr...</i>	876	876	97% 0.0 97.84%
<input type="checkbox"/> <i>Nothophoma quercina</i> strain Zbf-R8 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and i... <i>Nothophoma qu...</i>	876	876	98% 0.0 97.48%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Ascochyta medicaginicola</i> strain Zbf-F1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene a... <i>Ascochyta medi...</i>	876	876	97% 0.0 97.67%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Dothiorella</i> sp. Liaoning-Rsf019 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S rib... <i>Dothiorella sp...</i>	876	876	96% 0.0 98.03%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Leptosphaerulina australis</i> strain 10_19_M13F_F10J 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribe... <i>Leptosphaerulin...</i>	876	876	98% 0.0 97.31%

Example 3 (Bottom): Job Title: Nucleotide Sequence. RID: W28UMDBX013. Program: BLASTN. Database: nt. Query ID: Ict|Query_34043. Description: None. Molecule type: dna. Query Length: 498. Other reports: Distance tree of results, MSA viewer. Filter Results: Organism (exclude), Percent Identity (to), E value (to), Query Coverage (to). Filter, Reset.

Organism	Percent Identity	E value	Query Coverage
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Cochliobolus kusanoi</i> strain CS11706 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5... <i>Curvularia kusa...</i>	885	885	99% 0.0 98.99%
<input type="checkbox"/> <i>Cochliobolus kusanoi</i> strain NBRC 100198 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge... <i>Curvularia kusa...</i>	885	885	100% 0.0 98.80%
<input type="checkbox"/> <i>Phoma</i> sp. NRRL 54532 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tra... <i>Phoma sp. NR...</i>	885	885	100% 0.0 98.80%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Curvularia kusanoi</i> strain YZ10-1-5-1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spa... <i>Curvularia kusa...</i>	883	883	96% 0.0 99.79%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Epicoccum sorghinum</i> strain LC11819 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp... <i>Epicoccum sorg...</i>	883	883	96% 0.0 99.79%
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Cytospora</i> sp. strain LCM 892S2.01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spac... <i>Cytospora sp.</i>	883	883	96% 0.0 99.79%

Figura 14. Ejemplos de búsquedas realizadas utilizando la herramienta “BLAST” en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) usando secuencias ITS provenientes de aislamientos pertenecientes a *Boeremia* sp. Imágenes tomadas de: (NCBI, 2020).

2.3 Tendencia del diagnóstico de hongos en semillas

Hasta ahora, la mayoría de las especies y otros taxones intra-específicos se determinan inicialmente basándose en la morfología y medios de cultivo. El análisis de secuencias de genes es utilizado actualmente como complemento confirmativo o distintivo.

Basado en la propagación sexual y asexual de los hongos existe un sistema dual en su nomenclatura bajo el enfoque morfológico (anamorfo y teleomorfo), el cual tiene grandes limitaciones ya que las características morfológicas están sujetas a las variaciones medioambientales. Este tipo de limitaciones, es decir, realizar la detección hasta nivel de especie se ha podido superar en parte, gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular y su estandarización.

A lo largo de la historia en el diagnóstico de hongos se han empleado diferentes técnicas moleculares con el fin de facilitar el trabajo de los taxónomos y fitopatólogos y de esta manera poder organizar filogenéticamente a los individuos, así como a sus parientes más cercanos.

Dentro de las técnicas empleadas por los micólogos en investigaciones taxonómicas se encuentran la evaluación de: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD), Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), Huellas digitales de amplificación de ADN (DAF) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La determinación a nivel de especie en hongos, se basa principalmente en secuencias de zonas altamente conservadas como la subunidad pequeña y la subunidad grande del ADN ribosomal y espaciadores internos transcritos. Así mismo, se han utilizado otros marcadores basados en ADN mitocondrial y genes de β -tubulina, entre otros.

Los avances en las tecnologías de secuenciación de ADN y análisis bioinformáticos han revolucionado la sistemática de hongos y el desarrollo de metodologías de diagnóstico mucho más precisas. Para el caso de instituciones como los bancos de germoplasma, contar con avances tecnológicos que permitan desarrollar metodologías de diagnóstico altamente sensibles, optimiza los procesos de transferencia de material vegetal, ya que se disminuyen los riesgos de introducción y desplazamiento de enfermedades de tipo cuarentenario de una zona geográfica a otra durante los procesos de distribución de germoplasma.

3. Planteamiento del problema

La distribución de enfermedades de tipo cuarentenario en plantas ha aumentado a niveles dramáticos durante los últimos años. Aspectos comerciales, el cambio climático y la globalización contribuyen a ello, debido a la menor capacidad de resiliencia de los sistemas de producción agrícola y la intensificación de la agricultura a través de los años.

Gran variedad de patógenos transmitidos a través de las semillas de cultivos comerciales plantea un riesgo inminente para la seguridad alimentaria. Los cambios y transformaciones del comercio mundial que permiten a dichos patógenos avanzar más rápidamente que antes y los efectos del cambio climático que crea condiciones favorables para el establecimiento de enfermedades donde antes no las había, facilitan su distribución transfronteriza.

Para algunos patógenos, existen opciones de gestión que permiten controlar las invasiones y determinar mecanismos de erradicación de enfermedades. Para muchos otros no hay forma de detener dicha invasión, incidiendo negativamente en la seguridad alimentaria. En ambos casos, un análisis detallado del riesgo de distribución de enfermedades a través de semillas y una fuerte vigilancia cuarentenaria, será mucho más eficiente y mucho más económico que llevar a cabo mecanismos de control fitosanitario y de esta manera reducir al mínimo el establecimiento de una enfermedad.

Las nuevas enfermedades pueden llegar a alcanzar efectos catastróficos en la producción agrícola de un país. Históricamente una enfermedad de las plantas conocida como la mancha de Ascoquita causada por el hongo *P. exigua*, causa grandes pérdidas a nivel económico en cultivos importantes como el de la papa y leguminosas forrajeras. Actualmente, una o nuevas cepas de hongos fitopatógenos amenazan a cultivos básicos para la alimentación humana.

Las enfermedades que afectan a las plantas tienen la capacidad de propagarse de manera fácil y rápida de una zona geográfica a otra, provocando extinciones masivas de cultivos. Los focos de infección y los mecanismos de control de enfermedades deficientes pueden provocar pérdidas económicas incalculables en los cultivos comerciales, afectando significativamente los medios de sustento de pequeños y medianos agricultores, así como la seguridad alimentaria y nutricional de millones de personas alrededor del mundo.

Económicamente hablando, los efectos de las enfermedades transmitidas a través de semillas pueden ser altamente complejos. En casos muy puntuales el efecto económico real fluctuará dependiendo del tipo de enfermedad, así como la disponibilidad de mecanismos de control. En muchos casos la complejidad de la enfermedad suele dificultar una cuantificación precisa de los efectos económicos.

La disminución de los ingresos agrícolas es el efecto económico predominante cuando una enfermedad de tipo cuarentenario se traslada de una zona geográfica a otra, debido a la pérdida parcial o total de la producción. La seguridad alimentaria se vería afectada negativamente a nivel local, cuando la economía local depende de uno o varios productos agrícolas básicos vulnerables. Si por el contrario el sistema agrícola y/o cultivos particulares se encuentran relativamente diversificados o poseen fuentes de ingresos adicionales, se reducirá notablemente la importancia del aspecto económico.

Numerosas enfermedades producidas por hongos pueden ser transmitidas por las semillas. El agente patógeno puede estar alojado en la cubierta seminal y/o albumen o estar ubicado en el tejido embrionario. En el primer caso se dice que la contaminación es externa y la semilla únicamente “transporta” el agente patógeno, mientras que en el segundo caso hay una verdadera “transmisión”.

Los patógenos o plagas transmitidas por la semilla o asociados a ésta pueden ser transportados en la superficie de la semilla (como, por ejemplo, hongos y bacterias), dentro de la semilla (bacterias, hongos y virus que infectan los tejidos internos) y con la semilla (insectos, nematodos, esporas en reposo de algunos hongos como carbonos y esclerocios de *Claviceps* sp. En todos los casos, hay especies patógenas de importancia cuarentenaria y económica, sin importar dónde se ubican en la semilla o si pueden ser transmitidas a las plantas recién formadas, directamente desde la semilla infectada.

Por tal razón, es responsabilidad de los bancos de germoplasma distribuir semilla fitosanitariamente aceptada, es decir, que se encuentre libre de enfermedades y plagas de tipo cuarentenario. En este orden de ideas es importante definir, si es posible desarrollar una metodología de identificación molecular del hongo *P. exigua* para ser usada como prueba confirmatoria en el diagnóstico fitosanitario en semillas de fríjol y forrajes tropicales, una vez haya finalizado la búsqueda de información relacionada con el diagnóstico de este hongo a través del tiempo. Todo lo anterior enmarcado en el hecho de que actualmente el diagnóstico de *P. exigua*, desde el punto de vista morfológico se ve limitado debido a que es posible hallar estructuras que generan confusiones durante

el proceso de identificación, cuando no se cuenta con la experiencia necesaria en taxonomía, reconocimiento y diferenciación de estructuras reproductivas.

4. Justificación

Los bancos de germoplasma tienen la responsabilidad de conservar y distribuir los materiales almacenados garantizando su calidad sanitaria, fisiológica y genética. El proceso de conservación comprende diferentes actividades que garantizan la calidad fitosanitaria de los materiales en custodia, las cuales van desde la regeneración de los materiales en condiciones de campo hasta la evaluación de la presencia o ausencia de patógenos en condiciones de laboratorio. La preservación de dicha calidad representa una alta inversión desde el punto de vista costo/beneficio la cual permitirá a futuro llevar cabo la distribución nacional o internacional del germoplasma conservado. Adicionalmente es de vital importancia cumplir con las disposiciones y normatividades fitosanitarias nacionales e internacionales garantizando los más altos estándares de calidad. Por tal razón la implementación de técnicas de diagnóstico mucho más específicas permitirá el uso eficiente de los recursos utilizados en el proceso de evaluación de hongos patógenos cuarentenarios.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Desarrollar una revisión sistemática para el establecimiento de una metodología de diagnóstico molecular para el hongo cuarentenario *Phoma exigua* en fríjol y forrajes tropicales de la Alianza Bioersity - CIAT.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la disponibilidad de regiones de ADN en bases de datos que permitan la diferenciación de especies del género *Phoma* sp.
- Establecer un flujo de trabajo para el desarrollo de una técnica de diagnóstico molecular basado en la revisión sistemática realizada.

6. Metodología

Este documento parte de la necesidad de aumentar la eficiencia en el diagnóstico del hongo *Phoma exigua* y ha sido dividido en cuatro capítulos con el objeto de desarrollar una metodología de diagnóstico para lo cual se requiere en el primer capítulo, realizar una descripción detallada acerca de las debilidades y fortalezas del diagnóstico basado en caracteres morfológicos, teniendo como punto de partida y a modo de ejemplo las actividades de diagnóstico y monitoreo fitosanitario, llevadas a cabo por el Laboratorio de Sanidad de Germoplasma de la Alianza Bioersity - CIAT.

En el segundo capítulo del documento se realiza una revisión bibliográfica, enfocándose principalmente en la taxonomía y los conceptos descriptivos del género *Phoma* sp., partiendo desde su primer reporte hasta la actualidad, basándose en el proyecto internacional *Index Fungorum*. Mediante el uso de un lenguaje altamente sistemático, se exponen las modificaciones en la nomenclatura del género y la especie *P. exigua* a lo largo de la historia, basadas en los artículos científicos que evidencian dichas modificaciones. Adicionalmente, en este segundo capítulo se busca condensar a modo de tabla, toda la información actualmente disponible de los descriptores taxonómicos del hongo *Phoma exigua*, y de esta manera proporcionar una herramienta que facilite el proceso de identificación morfológica por parte de fitopatólogos e investigadores.

Posteriormente, en el tercer capítulo se exponen las metodologías de diagnóstico más relevantes, así como aquellas que han sido más utilizadas para el diagnóstico de *P. exigua* a lo largo de la historia. Esto con el fin de identificar con mayor claridad las limitaciones actualmente existentes en el diagnóstico de esta especie cuarentenaria.

Finalmente, en el cuarto capítulo del documento se propone un flujo de trabajo para desarrollar una metodología de diagnóstico molecular del hongo *P. exigua* con base en la información hallada, así como en las actividades piloto llevadas a cabo por el LSG.

La estrategia de la búsqueda electrónica de los documentos para hacer la revisión bibliográfica en bases de datos públicas tales como Scopus, PubMed Central, Web of Science y Dimensions, incluyeron los siguientes criterios y ecuaciones de búsqueda:

- “Phoma”
- “Boeremia”
- “Phoma exigua”
- “Boeremia exigua”
- “Phoma exigua” + “seed borne”
- “Phoma exigua” “ABSTRACT”
- “Phoma exigua” “DOCUMENT TYPE”
- “Phoma exigua” NOT fungicide
- “Phoma exigua” NOT fungicide + “Boeremia exigua”

Una vez haya sido creada la base de datos global con los documentos encontrados, se realizará una depuración manual con el fin de eliminar aquellos artículos que se encuentren duplicados. Se eliminarán tanto los documentos duplicados presentes en una misma base de datos, así como aquellos que se encuentren duplicados al comparar las cuatro bases de datos entre sí. Adicionalmente al proceso de depuración manual, se eliminarán aquellos documentos que no ofrezcan información relacionada con actividades de diagnóstico e identificación taxonómica pertinentes al género *Phoma* sp.

En esta revisión se abordará la información partiendo desde conceptos generales a conceptos específicos, iniciando con el planteamiento de las generalidades de los hongos, realizando una mirada retrospectiva acerca de la clasificación del género *Phoma* sp. y cómo se llevan a cabo las identificaciones de las especies dentro del mismo género, con el fin de esclarecer la clasificación del hongo *Phoma exigua*, y de esta manera comprender sus particularidades taxonómicas. Se describirán cuáles son aquellas metodologías que han sido empleadas para la identificación del género *Phoma* sp. y algunas de sus especies, haciendo especial énfasis en *P. exigua*.

7. Resultados de las búsquedas

Utilizando los criterios y las ecuaciones de búsqueda seleccionados se halló un total de 840 documentos en las bases de datos consultadas. El número de artículos hallados en cada base de datos se relaciona en la Tabla 1.

Finalizada la depuración manual y eliminación de artículos científicos no relacionados con diagnóstico y taxonomía, se obtuvo un total de 99 documentos para realizar las respectivas consultas y extracción de datos.

Tabla 1. Relación de número de artículos hallados en las bases de datos consultadas.

Base de datos	Número de artículos
Scopus	346
PubMed Central	188
Web of Science	76
Dimensions	230

8. Revisión bibliográfica

8.1 Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos que por lo general sus cuerpos están compuestos de hifas filamentosas que pueden ser multicelulares o multinucleadas, las cuales pueden llegar a formar grandes redes entretejidas llamadas micelios. Los núcleos mitóticos suelen ser por lo general haploides. Constan de una pared celular formada de quitina (en algunos casos particulares de celulosa).

Todos los hongos son heterótrofos, asociados al parasitismo o como simbioses. Su alimentación es absorptiva y para esto secretan una gran cantidad de enzimas digestivas hacia el exterior de sus cuerpos, absorbiendo los nutrientes liberados.

La reproducción de los hongos es altamente variable y compleja. La reproducción asexual puede llevarse a cabo por la fragmentación del micelio o a través de la liberación de esporas asexuales. Las esporas sexuales son formadas mediante la fusión de dos núcleos haploides compatibles dando lugar a un cigoto diploide que posteriormente por meiosis dará lugar a esporas sexuales haploides. Estas producen micelios haploides mediante la mitosis.

Los hongos son los mayores descomponedores presentes en los ecosistemas, gracias a sus cuerpos filamentosos, penetran los suelos con gran facilidad descomponiendo el material orgánico y liberando gran cantidad de nutrientes, resultado de la digestión extracelular. La gran mayoría de las enfermedades observadas en plantas son causadas por hongos parásitos. Algunos hongos parásitos pueden ayudar a controlar plagas que atacan cosechas y otros pueden causar graves enfermedades en animales incluyendo al hombre.

Existe una gran variedad de asociaciones simbióticas de los hongos con otros organismos tales como las observadas en los líquenes o las micorrizas. En estos casos particulares, el hongo obtiene los nutrimentos producto de la fotosíntesis y a cambio aporta protección y sostén a la planta (Audesirk et al., 2008).

Se estima que existen alrededor de 1,5 millones de especies en el mundo, esto significa que los hongos son unos de los recursos biodiversos menos explorados en nuestro planeta. Es notoria la dificultad que se tiene para delimitar este grupo de otros eucariotas y gran cantidad de debates y discusiones se han suscitado acerca de las inclusiones y exclusiones de ciertos organismos en este reino por más de un centenario.

En años recientes, los principales argumentos han sido expuestos por los taxónomos, con el fin de definir claramente este grupo de organismos. Algunos están enfocados en alcanzar una definición filogenética basada especialmente en la similitud de secuencias de ADN relevantes, y otros que adoptan un enfoque netamente biológico del tema y consideran a los hongos como organismos que comparten todas o muchas características ecológicas o fisiológicas clave (Webster & Weber, 2007).

8.2 Clasificación taxonómica de los hongos.

Siguiendo la clasificación establecida por Linneo en el año 1753, la clasificación de los hongos se ha basado en la descripción y comparación de sus caracteres morfológicos, agrupando a individuos morfológicamente similares dentro de un mismo grupo. Con el fin de establecer criterios de orden jerárquico se ha adoptado la siguiente conformación basada en taxones (Fig. 15).

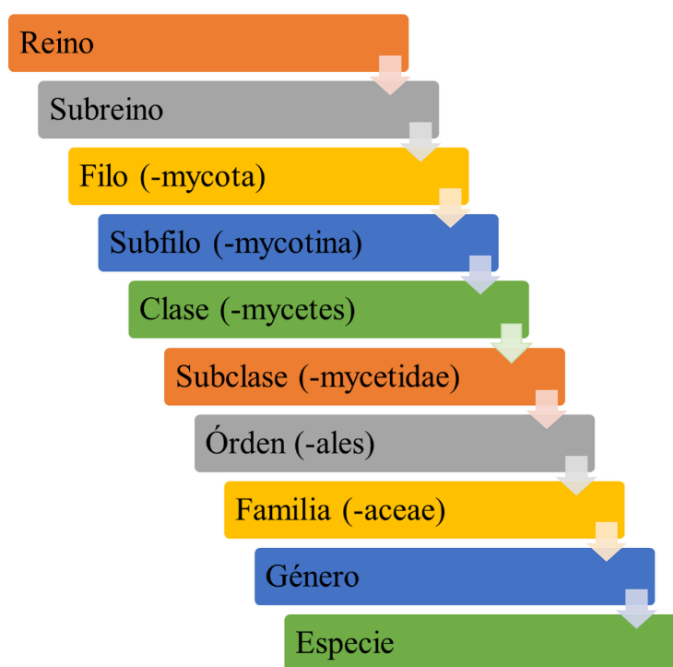


Figura 15. Rangos de clasificación taxonómica con las respectivas terminaciones utilizadas en la clasificación de los hongos (Hibbett et al., 2007).

8.3 Generalidades de *Phoma* sp.

Phoma sp. es un género cosmopolita que pertenece a la Clase Celomicetos. Los celomicetos pueden producir sus conidias (esporas asexuales) en picnidios o acérvulos. Los individuos de esta subclase que producen picnidios se encuentran ubicados en el orden Sphaeropsidales y los que producen acérvulos están ubicados en el orden Melanconiales (Alexopoulos et al., 1996).

La estructura distintiva de los Sphaeropsidales claramente son los picnidios. El picnidio puede presentar ciertas diferencias en apariencia dependiendo del género al que pertenezca los cuales pueden ser: papilados, puntiagudos, setosos, uniloculados, laberintiformes, formadores de cirros (Fig. 16).

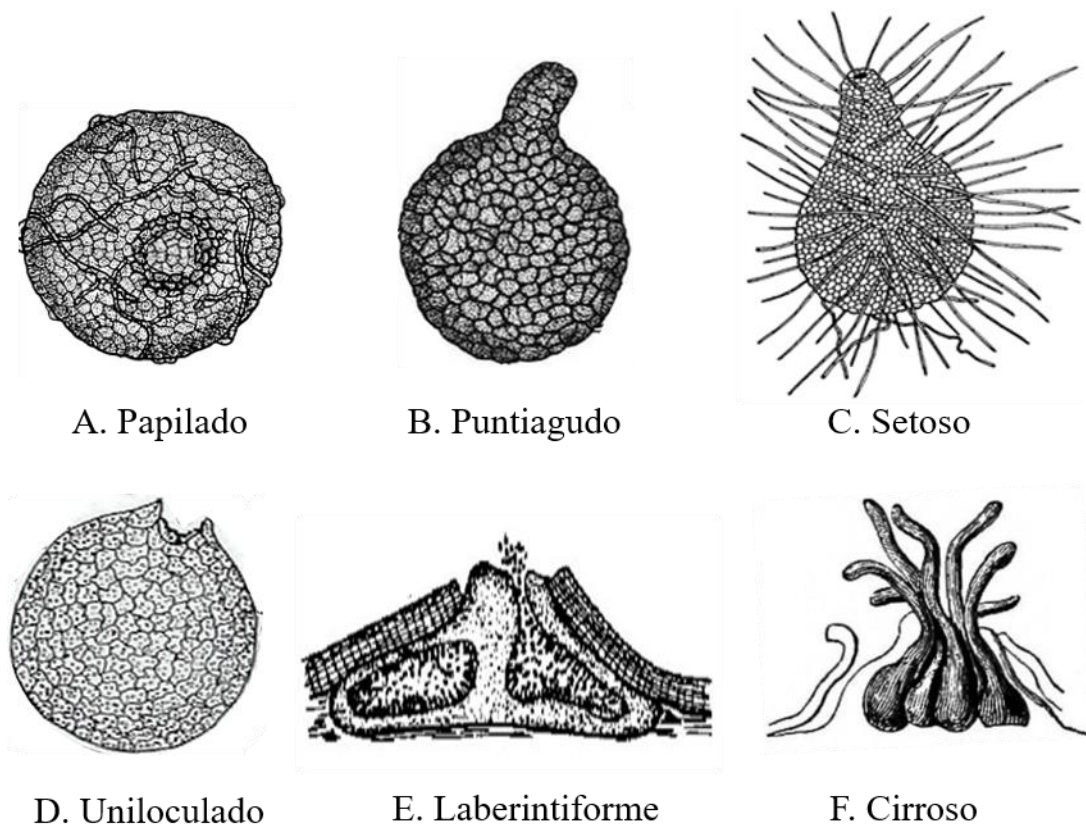


Figura 16. Varios tipos de picnidios presentes en el orden Sphaeropsidales. Adaptado de: Alexopoulos et al., 1996.

En este orden de ideas, los picnidios pueden ser superficiales, sumergidos, globosos, alargados, en forma de copa, uniloculares, multiloculares y pueden ser de colores oscuros o claros. Adicionalmente ellos pueden producirse de manera separada o estar agregados. Tradicionalmente los Sphaeropsidales han sido divididos en cuatro morfo-familias con base en las características picnidiales. Estas morfo-familias son: **Sphaeropsidaceae** – picnidios oscuros, globosos, correosos o carbonosos, estrómaticos o no-estromáticos, generalmente (pero no siempre) previstos de una apertura circular. **Nectrioidaceae** – picnidios como los observados en Sphaeropsidaceae, pero de color claro en lugar de oscuros, y

blandos o cerosos en vez de duros y rígidos; **Leptostromataceae** - picnidios en forma de escudo o alargados, aplanados; **Excipulaceae** (Discellaceae) cuando sus picnidios han madurado pueden ser más o menos en forma de copa o en forma de platillo (Alexopoulos & Mims, 1979).

En los celomicetos, la mayoría de los picnidios liberan sus esporas en una masa húmeda que se expulsa a través del poro apical (ostiolo). Estas a menudo se acumulan en grandes cantidades y son transportados por insectos o fluyen junto con el agua de lluvia.

El científico William Grove en 1919, introdujo el término celomicetos, es decir, "hongos con un celoma o una cavidad", para acomodar los géneros *Phyllosticta*, *Phomopsis* y *Pleospora*, ya que producen conidias dentro de una cavidad. Inicialmente el concepto debió ampliarse con el fin de incluir todos aquellos géneros que producían conidias dentro de una cavidad o en forma de cojín (matriz fúngica). Posteriormente los micólogos se dieron cuenta que los celomicetos son un grupo artificial (Wijayawardene et al., 2016). Es decir, que las divisiones que forman este grupo se basan en la morfología y no en un trasfondo filogenético común, razón por la cual los micólogos empezaron a usar este término por conveniencia.

Inicialmente los celomicetos estaban ubicados dentro de la subdivisión Deuteromycotina en la cual estaban agrupados todos los hongos que poseían solo un mecanismo de reproducción asexual, los cuales fueron llamados "hongos imperfectos". Actualmente y basado en estudios filogenéticos posteriores se ha demostrado su naturaleza polifilética (existencia de más de un ancestro) del taxón; ocasionando que el término de "hongos imperfectos" esté completamente obsoleto, usándose solo por motivos de practicidad en la fitopatología y el área clínica (Valenzuela, 2018).

Hablando de los hongos celomicetos en un sentido estricto como un grupo morfológico, estos son capaces de habitar una amplia gama de nichos ecológicos predominantemente terrestres, hallándose como saprófitos o patógenos en plantas. Se pueden encontrar también presentes libres en el suelo o como endófitos de plantas. Han sido reportados en ambientes acuáticos asociados a plantas tanto de agua dulce como salada, incluyendo las aguas residuales. Algunos han sido observados parasitando otros hongos y en raras ocasiones como patógenos de insectos y vertebrados (incluyendo el ser humano) (Valenzuela, 2018).

8.4 Una mirada hacia la biología de *Phoma* sp.

El nombre *Phoma* sp. fue otorgado por Saccardo en 1880. Inicialmente el género había sido reconocido como un patógeno presente en tallos de plantas, sin embargo, actualmente puede ser aislado de un rango amplio de substratos. Tal es el caso de especies como *P. herbarum*, *P. glomerata*, *P. pomorum* var. *pomorum* y *P. eupyrena* las cuales han sido aisladas de materiales inorgánicos como asbesto, cemento, pintura de aceite y yeso, químicos (*P. herbarum*), pintura (*P. glomerata*) y elementos de vajilla (*P. pomorum* var. *pomorum*) (Aveskamp et al., 2008).

La gran gama de substratos en los cuales se ha observado la presencia de especies pertenecientes al género *Phoma* sp. revela su gran capacidad como degradador de material orgánico, jugando un papel importante dentro de los ecosistemas a los que pertenece.

Actualmente se sabe que más del 50% de las especies descritas se han observado creciendo en tejidos vivos, ya sea como hongos oportunistas o como patógenos primarios.

Las infecciones reportadas hasta el momento se han observado en animales y humanos de las cuales se han identificado nueve especies. Recientemente se ha adicionado a *P. exigua* dentro de la lista de patógenos que son capaces de generar infecciones importantes en los seres humanos (Rai et al., 2009)

Adicional a las infecciones presentadas en humanos, varias enfermedades en animales han sido asociadas al género *Phoma* sp. tales como la mastitis micótica bovina, micosis del pescado en salmón y trucha. Infecciones presentadas en organismos presentes en el suelo como nematodos y artrópodos. 11 especies pertenecientes a *Phoma* sp. fueron relacionados con la formación de quistes en nematodos además de estar presentes en la infección de otros hongos y oomicetos.

Más de 110 especies de *Phoma* sp. están relacionadas como hongos fitopatógenos afectando un sin número de familias vegetales entre las que se incluye la familia de las Brassicaceas afectada por *P. megicaginis* causando la enfermedad denominada “Black Leg” (Aveskamp et al., 2008).

Además del impacto generado por las pérdidas en la producción de especies vegetales comerciales, el género *Phoma* sp. limita la libre distribución de germoplasma, debido a la capacidad de ser transmitido a través de la semilla en variedades comerciales de frijón y pastos tropicales, siendo considerado como un hongo cuarentenario de vigilancia permanente (Urinzwenimana et al., 2017)

Gran cantidad de material vegetal debe ser eliminado una vez se ha reconocido la presencia de especies patógenas presentes en el germoplasma a distribuir.

Es imperativo encontrar las medidas necesarias que permitan realizar un diagnóstico rápido y eficiente con el fin de agilizar los procesos de inspección relacionados con la importación o exportación de material vegetal de importancia económica, académica e investigativa.

Existen algunos casos especiales donde la capacidad patogénica de *Phoma* sp. es utilizada como biocontrol, tal es el caso de *P. herbarum*, *P. exigua* y *P. macrostoma* los cuales son usados como bioherbicidas en el control de *Taraxacum* spp., *Clematis vitalba*, *Gaultheria* spp. e individuos pertenecientes a la familia Caryophyllaceae (Aveskamp et al., 2008).

8.5 Ciclo de vida: *Phoma* sp.

A pesar de que el ciclo de vida depende del hospedero o nicho en el cual se encuentre, el ciclo de vida de los individuos pertenecientes a este género es prácticamente el mismo en todas las especies patógenas (Fig. 17) (Aveskamp et al., 2008).

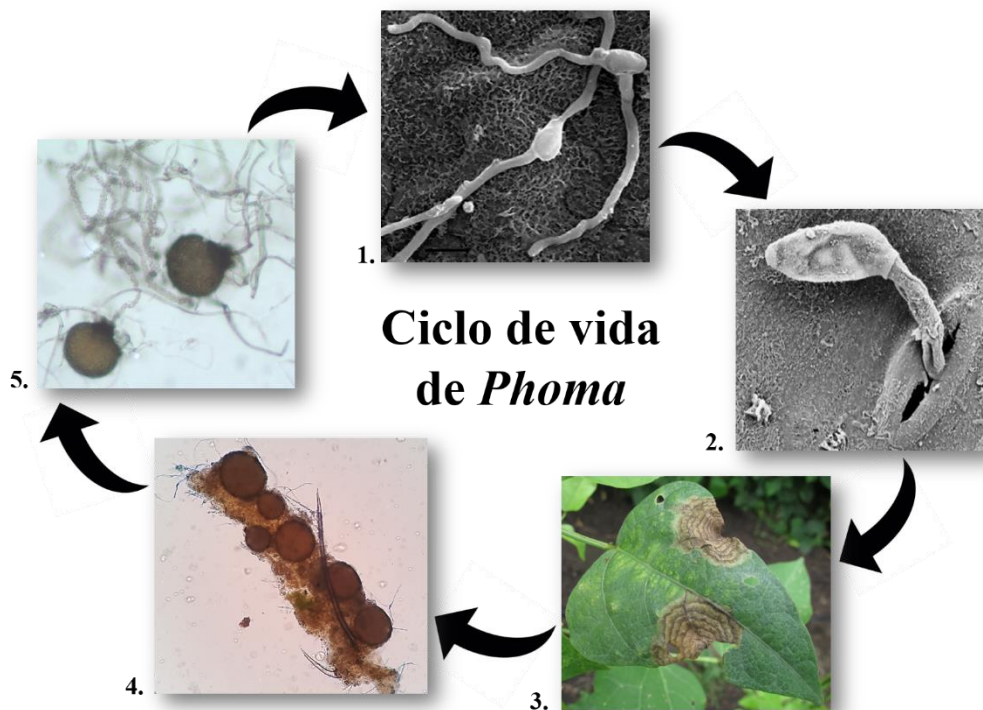


Figura 17. Ciclo de vida *Phoma* sp. **1.** Entre 6 – 12 horas después de la infección (hdi), inicia el proceso de germinación conidial con la formación del tubo germinativo y la hifa primaria (peciolos, hojas, tallos, frutos, etc.). **2.** La infección temprana e invasión de tejido, ocurre 24 hdi esta se puede dar a través del tubo germinativo y la hifa primaria por penetración de heridas, estomas abiertos o por la formación de apresorios (los tubos germinales pueden hincharse de 2,5-3,0 μm de diámetro para formar cada apresorio). **3.** 48 hdi se aprecian los primeros síntomas visibles sobre el tejido vegetal infectado. Esto se debe a que hubo penetración de las células de la cutícula y hubo extensión de la infección a través de las células inmediatamente debajo de la cutícula, los tejidos invadidos mueren y colapsan formando áreas concéntricas deformadas. **4** Aproximadamente a las 96 hdi inicia la producción de las estructuras reproductivas (picnidios) sumergidas en el tejido vegetal infectado **5.** La dispersión de las conidias se produce a través de la salpicadura de agua lluvia, del viento, por contacto con animales, herramientas, etc. (Tran et al., 2016). Imágenes **1-2:** Fuente: (Tran et al., 2016). Imágenes **3-5:** Fuente propia.

Como suele ocurrir en la mayoría de las especies patógenas, estos ingresan a sus hospederos a través de heridas provocadas por agentes mecánicos, condiciones ambientales o provocados por otros organismos.

En muchas de las especies vegetales hospederas el ingreso se produce a través de los estomas o la epidermis de las plantas.

En la fase inicial de la infección las hifas crecen intracelularmente a través de los tejidos de la planta, lo cual es un proceso asintomático en el cual gradualmente se empiezan a observar la presencia de tejido necrótico cerca de la zona de ingreso del patógeno (Aveskamp et al., 2008).

Una vez las células del huésped están sujetas a fitotoxicidad o a una respuesta hipersensible permiten al hongo tener acceso a recursos del tejido vegetal muerto. Los avances de las lesiones se pueden observar macroscópicamente.

Después de un corto periodo de tiempo caracterizado por presentar oscurecimiento del tejido infectado se pueden observar la formación de picnidios globosos en forma de matraz con un ostiolo presentando un cuello corto.

8.7 Definición taxonómica del género *Phoma* sp.

El género *Phoma* sp. es considerado como uno de los géneros más grandes conocidos con más de 3000 taxones infragénicos reportados (Aveskamp et al., 2010).

Actualmente, las especies de *Phoma* sp. se pueden definir como hongos filamentosos que producen conidiomas picnidiales con células conidiógenas monofialídicas ampuliformes. Un collarín está presente en el ápice de esas células después de la producción del primer conidio. *In vitro*, los conidios hialinos son principalmente unicelulares, aunque en varias especies también se puede observar un pequeño porcentaje de conidios septados transversalmente.

Esta definición se aplica a más de 220 taxones inter e intraespecíficos, pero debe tenerse en cuenta que esta definición no se aplica necesariamente a las muestras en la naturaleza, ya que los conidios bicelulares o incluso pigmentados ocurren más a menudo *in vivo* (Aveskamp et al., 2008).

En 1954 en la celebración del VIII Congreso Internacional de Botánica se definió a *Phoma herbarum* Westend como la especie tipo de *Phoma* sp. (holotipo) lo que se conoce en taxonomía tradicional como “*nomem genericum conservandum*”; basando esta decisión en el sistema taxonómico de Saccardo (Boerema et al., 2004).

En un estudio sobre Hifomicetos, Hughes en el año 1953 introdujo la conidiogénesis taxonómica como criterio importante, una característica que luego se aplicó a todos los hongos conidiales, incluidas las especies de *Phoma* sp. (Aveskamp et al., 2008).

En *P. herbarum* y otras especies emparentadas las conidias hialinas unicelulares se generan en células menos diferenciadas que recubren la cavidad picnidial en una especie de brotación monopolar repetitiva.

La conidiogénesis parece iniciar con la formación de una papila y posteriormente se presenta la ruptura de la célula conidiogénica para dejar un “collarete” (engrosamiento periclinal). La doble pared celular de la primer conidia surge como nueva, su maduración es sincrónica con la ontogenia; la construcción de la pared de conidias producidas sucesivamente, comienza con la capa basal del tabique que queda después de la secesión de la conidia anterior, y la maduración sigue siendo sincrónica con la ontogenia (Fig. 18).

Los conidios se producen aproximadamente al mismo nivel por proliferación permanente. Esta conidiogénesis, asociada con una producción abundante de mucílago, es análoga a la de los Hifomicetos, reconocidos como fialídicos con ontogenia conidial blástica. Esto se denomina más precisamente fialídico de cadena falsa o sin cadena ya que los conidios se producen en masas o cadenas mucilaginosas que no se mantienen unidas por el material de la pared como en los fiálides verdaderos (Boerema et al., 2004).

8.7.1 Nomenclatura del género Phoma sp.

***Phoma* Sacc. emend. Boerema & G.J. Bollen**

Phoma Sacc. en *Michelia* 2 (1): 4. 1880 (acom ‘Fr. em.’; *nomen genericum conservandum*, VII Congreso Internacional de Botánica, Paris 1954), Corrección. Boerema & G.J. Bollen en *Persoonia* 8(2): 134–135. 1975.

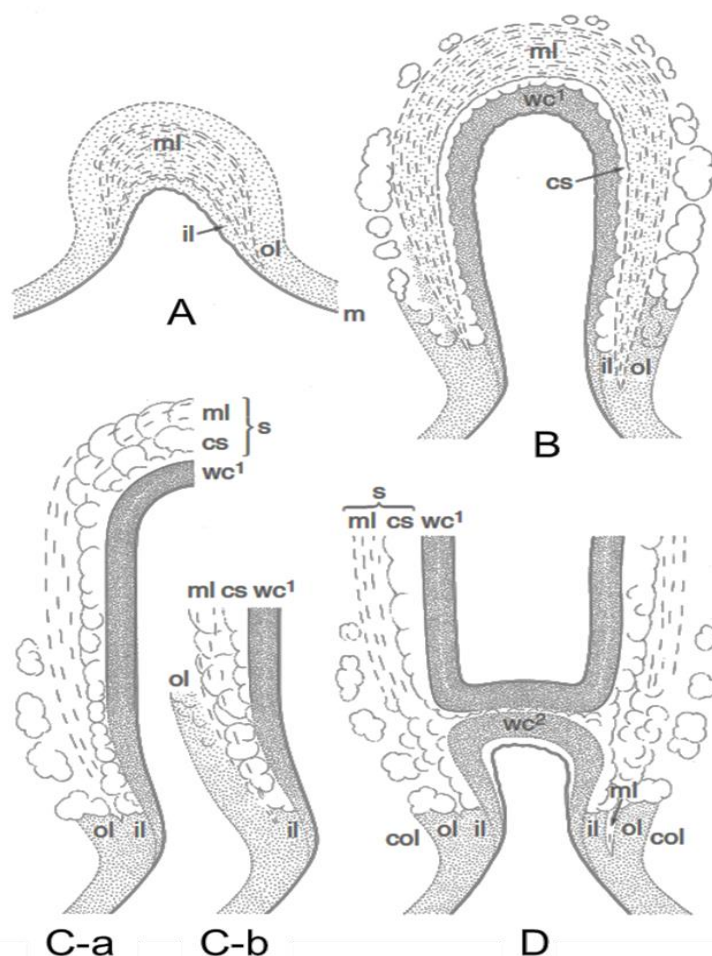


Figura 18. *Phoma* sp., Representación esquemática de observaciones al microscopio electrónico sobre la formación del primer conidio (A-D). Muestra primero (A) la formación de pared papilada de tres capas característica en la célula conidiógena antes de la iniciación del primer conidio; **m** = membrana plasmática. Cuando comienza la nueva construcción de la pared apical del primer conidio (**wc1** en B), la capa externa e interna de la papila (**ol** e **il**) se disuelven. La capa media notablemente hinchada (**ml**) parece funcionar como un “abridor” que luego también se disuelve en mucílago. La diferenciación de la pared conidial en una capa interna y externa por la construcción difusa de la pared (C a y b; maduración conidial sincrónico con la ontogenia del conidio) se asocia a la producción de una sustancia turbia (**cs**; no se forma igualmente abundantemente en todas las especies de *Phoma* sp.). Junto con el mucílago de la capa intermedia, forma la (s) vaina (s) mucilaginososa alrededor de la primera conidia. Después de la delimitación y separación por una doble pared (D) la parte basal de la papila original permanece como un collar (col); a veces, las diferentes capas de la papila (ol, ml, il) todavía son reconocibles en el collar (wc2 = pared de la inicial del segundo conidio). Nótese que la capa media de la papila no se observa en el collar menos conspicuo de la especie tipo de la sección *Pilosa*. Tomado de: (Boerema et al., 2004).

Especie lectotipo (VII Congreso Internacional de Botánica, Paris 1954): *Phoma herbarum* Westend. en Real Academia de la Ciencia. 19(3): 118. 1852; Lectotipo (Boerema in Persoonia 3(1): 10, pl. 1

figs 1, 2. 1964) en Herbario Westendorp & Wallays (BR): exs. Herb. crypt. Belg., Ed. Beyaerts-Feys, Fasc. 20, No. 965. 1854, en tallos de *Onobrychis viciifolia*.

8.7.2 *Teleomorfos relacionados*

Didymella Sacc. ex Sacc. in *Michelia* 2(1): 57. 1880.

Leptosphaeria Ces. & De Not. in *Comment. Soc. crittogam. ital.* 1(4) [=Schema Sfer.]: 234. 1863.

Mycosphaerella Johanson in *Öfvers. K. VetenskAkad. Förh.* 41(9): 163. 1884.

Pleospora Rabenh. ex Ces. & De Not. in *Comment. Soc. crittogam. ital.* 1(4) [= Schema Sfer.]: 217. 1863. (Boerema et al., 2004)

8.7.3 *Sinanamorfos correlacionados*

(Clamidosporas uni- y multicelulares)

Especies de *Epicoccum* Link in *Mag. Ges. naturf. Freunde, Berl.* 7: 32. 1816.

Especies de *Phialophora* Medlar in *Mycologia* 7: 202. 1915.

Especies de *Stagonosporopsis* Died. in *Annls mycol.* 10: 142. 1912.

Especies de *Sclerotium* Tode, *Flora Meckl.* 1: 2. 1790 : Fr., *Syst. Mycol.* 2: 246. 1823.

El género está actualmente vinculado a tres géneros teleomorfos diferentes. Si se conocen teleomorfos, residen en *Didymella*, *Leptosphaeria*, u ocasionalmente *Pleospora*.

En la literatura, las especies de *Phoma* sp. asociadas con otros estados también tienen géneros teleomorfos dentro de los Dothideomycetes, incluyendo *Mycosphaerella*, *Belizeana*, *Fenestella*, *Cucurbitaria*, *Preussia* y *Westerdykella*. Además, una gama de sinanamorfos de *Phoma* sp. han sido reconocidos en *Stagonosporopsis*, *Epicoccum*, *Phialophora* y *Sclerotium*. (Aveskamp et al., 2008).

Este tipo de complejidades morfológicas hacen mucho más difícil la identificación de individuos pertenecientes a este género. El concepto genérico de *Phoma* sp. y, por lo tanto, la clave de identificación se fundamenta en el establecimiento de nueve secciones (Tabla 2.) las cuales se

diferencian entre ellas basándose en la presencia o ausencia de uno o solo unos pocos caracteres taxonómicos. Sin embargo la notable ambigüedad de estas subdivisiones hace que varios caracteres específicos de una sección, puedan presentarse en una misma especie (Aveskamp et al., 2010).

Tabla 2. Nueve secciones de clasificación presente en el género *Phoma* sp. con sus asociados teleomorfos.

Sección	Especies tipo	Teleomorfo asociado Sinanamorfo facultativo*	Características seccionales
<i>Heterospora</i> ¹	<i>P. heteromorphospora</i> ²	* <i>Stagonosporopsis</i> ¹	Conidias claramente grandes además de las regulares ³
<i>Macrospora</i> ¹	<i>P. zae-maydis</i> ²	<i>Mycosphaerella</i> ¹	Conidias grandes, que miden 8–19 × 3–7 μm ³
<i>Paraphoma</i> ¹	<i>P. radicina</i> ²	* <i>Epicoccum</i> ¹	picnidio setoso ³
<i>Peyronellaea</i> ¹	<i>P. glomerata</i> ²	<i>Didymella</i> ¹ * <i>Epicoccum</i> ¹	Clamidosporas multicelulares ³
<i>Phoma</i> ¹	<i>P. herbarum</i> ²	<i>Didymella</i> * <i>Phialophora</i> ^{1,3}	
<i>Phyllostictoides</i> ¹	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i> ²	<i>Didymella</i> ¹	Conidias tabicadas pequeños además de las regulares ³
<i>Pilosa</i> ¹	<i>P. betae</i> ²	<i>Pleospora</i> ¹	Picnidios cubiertos por excrecencias pilosas ³
<i>Plenodomus</i> ¹	<i>P. lingam</i> ²	<i>Leptosphaeria</i> ¹ * <i>Phialophora</i> , <i>Sclerotium</i> ^{1,3}	Picnidios escleroplectenquimatosos ³
<i>Sclerophomella</i> ¹	<i>P. complanata</i> ²	<i>Didymella</i> ¹	Picnidio de paredes gruesas ³

Fuente: (Boerema et al., 2004)¹, (Aveskamp et al., 2008)², (Aveskamp et al., 2010)³.

Tres de estas secciones incluyen a especies de *Didymella* como sus teleomorfos y una de las secciones incluye a *Mycosphaerella* como teleomorfo; otra sección tiene una fuerte relación genética con géneros como *Leptosphaeria* y otra con el género *Pleospora* (Boerema et al., 2004)

Desafortunadamente, varios caracteres que están vinculados a una determinada sección, a veces también parecen ocurrir en especies que se colocan en otros grupos taxonómicos. Es importante mencionar que estas secciones se basan única y exclusivamente en caracteres morfológicos y fisiológicos en muchos casos limitados y carecen de una confirmación biológicamente realista mediante el uso de herramientas moleculares (Aveskamp et al., 2010).

Como ejemplo, En el (2004) Boerema et al. mencionaron que las especies ligeramente pilosas, *P. anserina* y *P. leonuri* no se alojan en la sección *Pilosa* o *Paraphoma*. Según la apariencia de sus conidios, estas especies se han colocado en las secciones *Phoma* y *Plenodomus*, respectivamente. Este enfoque ambiguo ha dado como resultado múltiples superposiciones entre las secciones separadas (Aveskamp et al., 2008).

De acuerdo a Boerema et al. (2004), la sección *Phoma* comprende especies "que tienen mucho en común con *P. herbarum*". Pero como la mayoría de las especies están acomodadas dentro de esta sección, muestra la necesidad de realizar más investigaciones sobre la clasificación dentro del género.

La mayoría de las descripciones morfológicas se realizan en condiciones *in vivo*, así como las especies teleomorfas relacionadas. Actualmente existen muchas notas y resúmenes acerca de la ecología de individuos pertenecientes a *Phoma* sp., sin embargo, se basan en la relación estrecha con hospederos que tienen una alta importancia económica, sesgando la mayoría de la información.

Algunos ejemplos acerca de individuos pertenecientes a *Phoma* sp. como patógenos de plantas con una alta importancia económica son: *P. andigena* (tizón tardío de la papa) y *P. foveata* (gangrena de la papa), ambos incluidos en la lista de organismos cuarentenarios de la Organización Europea de Protección Vegetal (EPPO, por sus siglas en inglés). *P. betae* (enfermedad de la pata negra en remolacha y espinaca) es un patógeno transmitido por semilla muy conocido. *P. apiicola* (raíz de phoma y pudrición de la corona del nabo y el apio). *P. terrestris* (raíz rosada de la cebolla) y *P. lingam* (raíz seca y cancro o enfermedad de la pata negra en las Brassicaceas). Patógenos de cultivos de legumbres y forrajes como *P. sub-boltshauseri* (tizón o mancha foliar de frijol y caupí), *P. medicaginis* (tallo negro de la alfalfa) y *P. pinodella* (podredumbre del pie y tallo negro del guisante y trébol).

En plantas de tomate, *P. destructiva* (pudrición de frutos, tizón de hojas y tallos) y *P. lycopersici* (cancro, pudrición de tallos y frutos). En floristerías, crisantemos *P. chrysanthemicola* (pudrición de

la raíz y pudrición del tallo basal) y *P. ligulicola* (tizón de las rayas, mancha foliar y del tallo). En Amaryllidaceae *P. narcissi* (enfermedad de la mancha roja, quemaduras de las hojas).

También se tratan importantes patógenos vegetales oportunistas plurívoros como por ejemplo *P. exigua*, *P. macrostoma*, *P. multirostrata* y *P. sorghina* (común en los trópicos y subtropicos) (Boerema et al., 2004).

8.8 Consideraciones sistemáticas del género *Phoma* sp.

La introducción de secuencias de nucleótidos como caracteres filogenéticos desarrolló grandemente la sistemática fúngica. En (1997) Grondona et al. discutieron la pobre delineación entre la sección de *Phoma*, *Paraphoma* y los géneros *Pyrenochaeta* y *Pleurophoma*. Además, la relación entre las especies de *Ascochyta* sp. y *Phoma* sp. que producen conidios septados permanece sin resolver.

En (1975) Boerema & Bollen, diferenciaron a *Phoma* sp. de *Ascochyta* sp. en las diferencias en conidiogénesis y septación conidial. Los conidios de *Ascochyta* sp. son, básicamente, siempre de 2 células, debido a la euseptación temprana durante la conidiogénesis, mientras que en los conidios septados en *Phoma* sp. son raros en condiciones de laboratorio.

Aunque no es raro en la naturaleza, y están formados por una euseptación tardía. El análisis espectrométrico de los cristales formados por especímenes de ambos géneros parecía apoyar esta diferenciación. Sin embargo, más tarde en (1996) Faris-Mokaiesh et al. mostraron que *P. pinodella* y *A. pinoides* probablemente están estrechamente relacionados, basando sus conclusiones en una similitud en el patrón de bandas de los productos de PCR y RFLP. Esta relación entre las dos especies fue respaldada por análisis de secuencia de varias regiones genéticas.

En (1964) Boerana & van Kesteren cuestionaron a *Plenodomus lingam* y al género *Phoma* sp. debido a las diferencias en el desarrollo picnídico. Más tarde, los autores justificaron la recombinación basada en la similitud en la conidiogénesis: ambos taxones producen conidios a partir de fiálides unicelulares en forma de matraz, una característica que se considera específica para el género *Phoma* sp.

Esta decisión surgió nuevamente como punto de discusión en 1997, cuando los datos moleculares de la región ITS revelaron que *P. lingam* y su pariente relativo *P. wasabiae* solo estaban distantemente

relacionados con otros hongos fomoides. Esto condujo a la hipótesis de que el antiguo género *Plenodomus* había sido reducido incorrectamente a sinonimia y debería ser reubicado (Reddy et al., 1998).

Los sinanamorfos y teleomorfos de *Phoma* sp. han sido poco investigados hasta ahora, a excepción del complejo *P. lingam*. Pocas relaciones sinanamórficas han sido confirmadas hasta ahora por medio de técnicas moleculares. Arenal et al. en el (2000) demostraron que *P. epicoccina* y *Epicoccum nigrum* son sinanamorfos mediante el uso de datos de secuencias ITS, y sinonimizaron estas especies después de estudios microscópicos.

8.9 Conceptos generales para determinar especies del género *Phoma* sp.

Se han identificado y caracterizado numerosas cepas de *Phoma* sp. utilizando principalmente caracteres morfológicos *in vitro*. Como en la mayoría de los otros géneros fúngicos, estos caracteres incluyen el tamaño y la forma de los conidiomas, conidias y clamidosporas, pero también la producción de metabolitos y las tasas y patrones de crecimiento en diversos medios de cultivo.

Los caracteres relacionados con conidiomas picnidiales se utilizan principalmente para la diferenciación seccional. Los picnidios son muy variables en forma y tamaño, pero en la mayoría de las especies son globosos o subglobosos (Fig. 19A), o a veces piriformes debido a un cuello alargado (sección *Plenodomus*). En colonias más antiguas los picnidios pueden agregarse. El color varía según la especie, de amarillento a marrón-oliváceo u oliváceo-negro y depende de las condiciones de cultivo y la edad. Ocasionalmente, los picnidios son setosos como en la sección *Paraphoma* (Fig. 19B), o pilosos como en la sección *Pilosa* (Fig. 19C). Se pueden observar ostiolas únicos o múltiples, aunque en algunas especies (secciones *Sclerophomella* y *Plenodomus*) se encuentran picnidiosesclerocios (Fig. 19D) (Boerema et al., 2004).

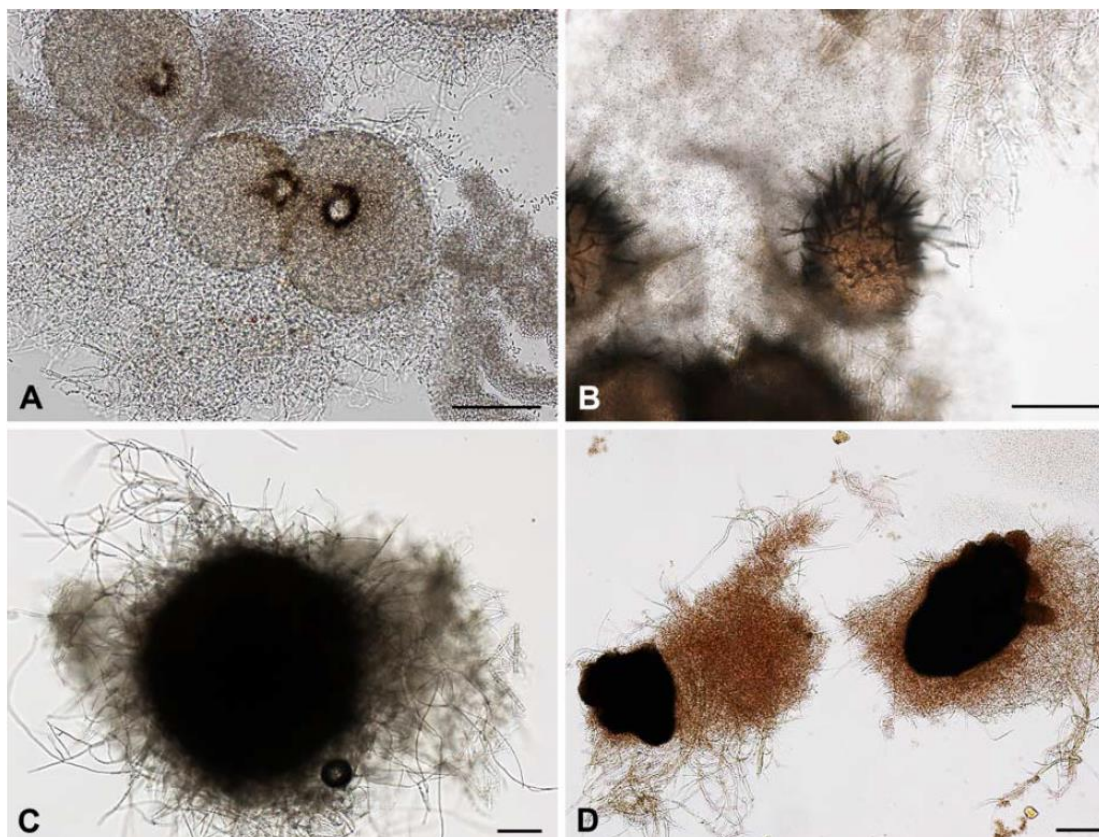


Figura 19. A-D. Tipos de picnidios. **A.** Regular glabro como en *P. herbarum* **B.** Setoso como en *P. carteri* **C.** Piloso como en *P. betae* **D.** Picnidios similares a picnoesclerocios como en *P. incompta*. Barras de escala = 100 μ m. Tomado de: (Aveskamp et al., 2008).

La presencia de clamidosporas multicelulares (Fig. 20) es a menudo una buena indicación de que una cepa pertenece a la sección *Peyronellaea*, aunque este no siempre es el caso. La forma de estas clamidosporas es, en la mayoría de los casos, comparable a los conidios multicelulares de *Alternaria* sp., llamadas alternaroides o alternaroides-botrioides (Fig. 20 A-D), pero en algunas especies se pueden encontrar pseudoescleroides o epicoccoides (Fig. 20E – 20I, respectivamente). La formación de clamidosporas unicelulares (Fig. 20 F-H) no se considera característica de ninguna sección en particular, pero puede ayudar a la identificación a nivel de especie (Aveskamp et al., 2009).

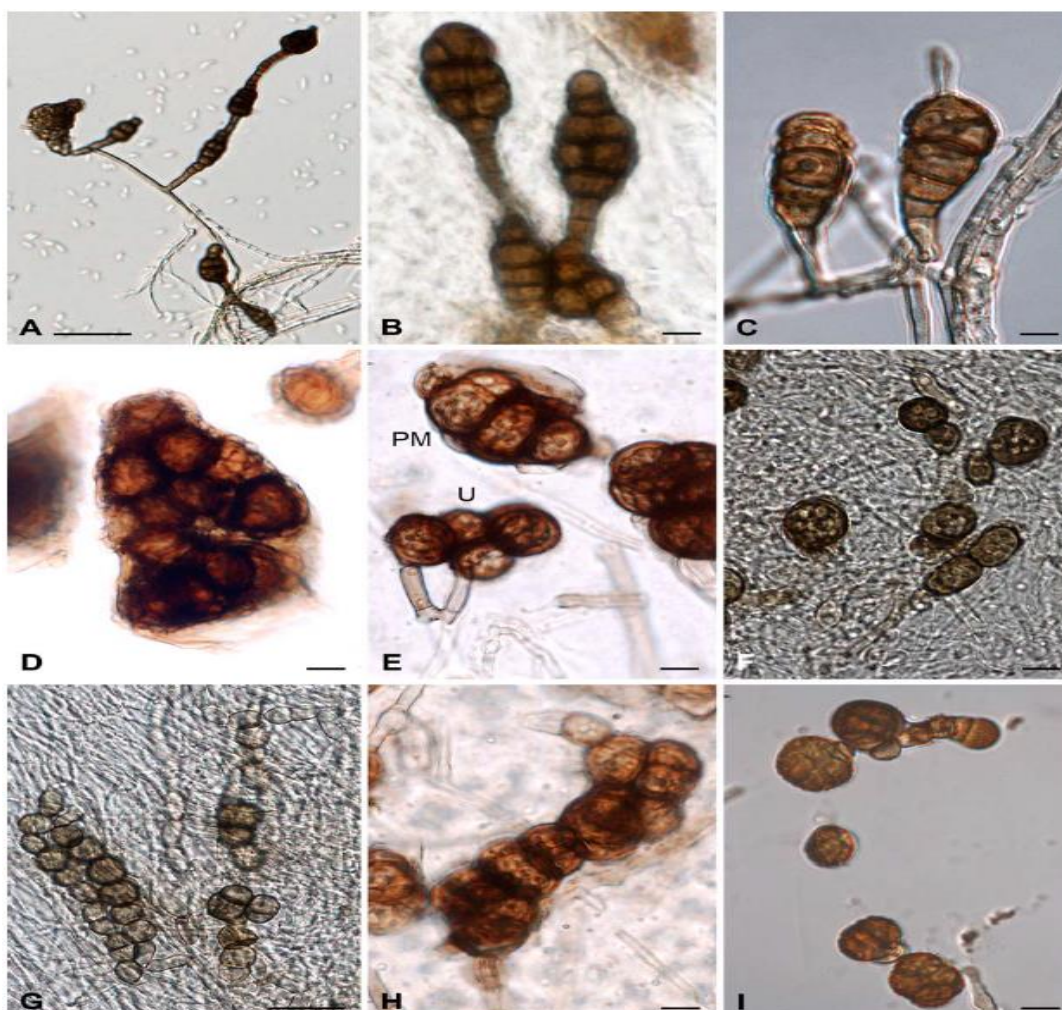


Figura 20. A-I. Morfología de la clamidospora en *Phoma* sp. **A.** Cadena de clamidosporas de *P. glomerata*. **B.** Clamidosporas alternaroides de *P. glomerata*. **C.** Clamidosporas alternaroides de *P. jolyana*. **D.** Clamidospora botrioide como en *P. sorghina* **E.** Clamidosporas multicelulares unicelulares (u) y pseudoesclerotioides (pm) en *P. chrysanthemicola*. **F.** Clamidosporas unicelulares de *P. pinodella* **G.** Cadena de clamidosporas unicelulares en *P. clematidina*. **H.** Cadena de clamidosporas unicelulares en *P. chrysanthemicola*. **I.** Clamidosporas epicoccoides en *P. epicoccina*. Barras de escala: A = 100 μm , G = 50 μm , B-F y H-I = 10 μm . Tomado de: (Aveskamp et al., 2008).

Las conidias se forman en picnidios, y la forma y el tamaño de las conidias se consideran los indicadores más útiles para determinar una cepa hasta el nivel de especie, pero también se usan para diferenciar algunas secciones (Fig. 21). La conidia promedio mide $2.5\text{-}10 \times 1\text{-}3.5 \mu\text{m}$. Sin embargo, en la sección *Macrospora* se producen conidias agrandadas, que son de hasta $25 \times 9 \mu\text{m}$ (Fig. 21 K-L) (Aveskamp et al., 2008).

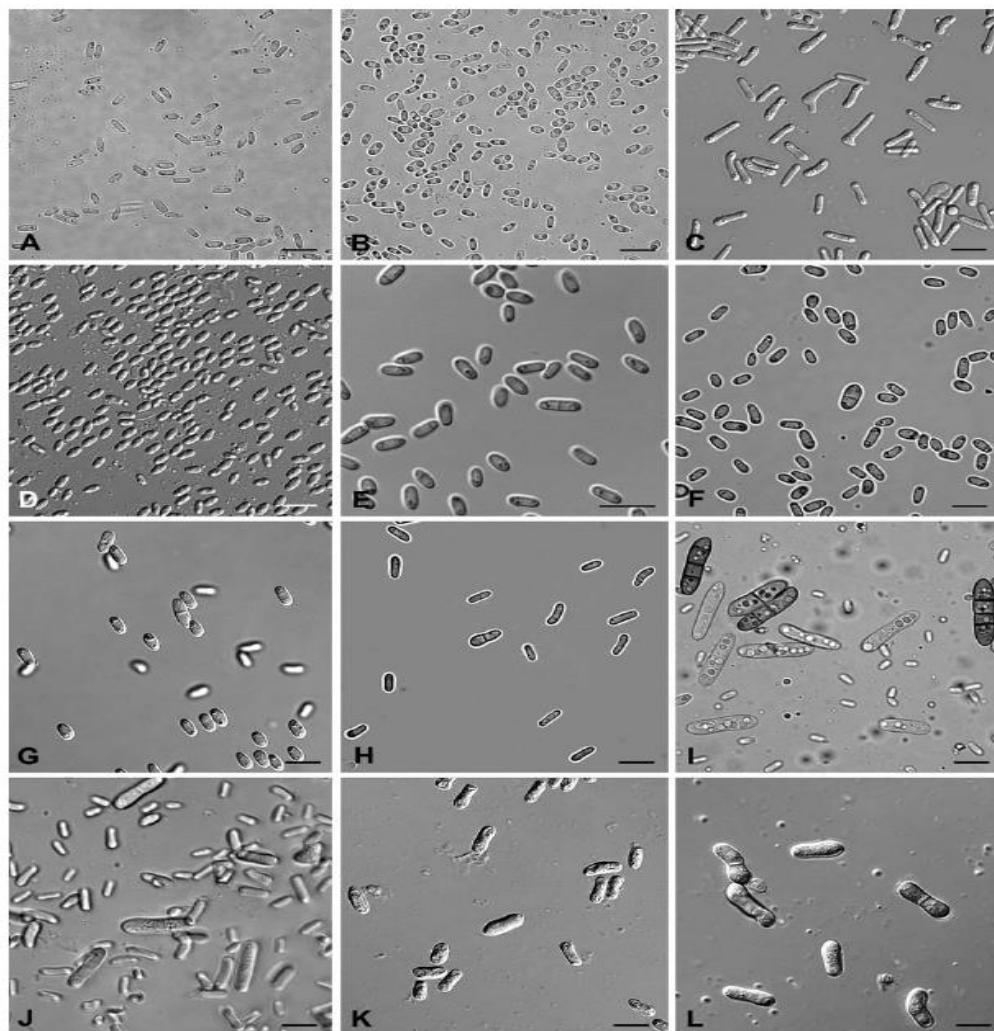


Figura 21. A-L. Morfología conidial en *Phoma* sp. **A-D.** Conidia hialina, aseptada de pequeño tamaño como en **A.** *P. herbarum* **B.** *P. multirostrata* **C.** *P. astragali* y **D.** *P. eupyrena*. **E-H.** Conidias hialinas, ocasionalmente septadas, de pequeño tamaño como en **E.** *P. exigua* **F.** *P. cucurbitacearum* **G.** *P. macrostoma* y **H.** *P. polemonii*. **I-J.** Las conidias generalmente hialinas de tamaño pequeño, con frecuencia presentan septos grandes, septadas y a menudo pigmentadas, ocurren en **I.** *P. actaeae* y **J.** *P. schneiderae*. **K-L.** Conidia hialina, ocasionalmente septada, pero todas relativamente grandes como en **K.** *P. rabiei* y **L.** *P. xanthina*. Barras de escala = 10 μ m. Tomado de: (Aveskamp et al., 2008).

In vivo, la proporción de conidios septados puede ser de hasta el 95%, lo que ha llevado a muchas identificaciones erróneas en *Ascochyta* sp. en el pasado y una gran cantidad de sinónimos para especies de *Phoma* sp. en *Ascochyta* (Van der Aa et al., 2000).

Las características morfológicas presentadas por *Phoma* sp. en diferentes medios de cultivo como tasa de crecimiento, formación de pigmentos, han servido como herramienta de identificación. De acuerdo a la literatura los medios de cultivos más utilizados en *Phoma* sp. son: Extracto de malta, Agar Avena y PDA (papa, dextrosa, agar) (Boerema et al., 2004).

Desafortunadamente, dentro de una sola especie, se puede observar una gran variabilidad, especialmente la presencia formaciones sectoriales o zonas picnidiales (Aveskamp et al., 2008). De acuerdo a observaciones realizadas en el LSG, existen individuos pertenecientes a *Phoma* sp. donde los picnidios están totalmente recubiertos por micelio y estos no se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo del medio, por el contrario, según lo mencionado por Aveskamp et al. 2008, se presentan agrupados o en zonas de desarrollo. Existen especies que producen una pigmentación rojiza bastante característica en el medio PDA, indicando que se trata de un hongo perteneciente al género *Phoma* sp., sin embargo, la sobreproducción de micelio denso, muchas veces dificulta la observación clara de picnidios, dificultando los procesos de evaluación.

En el LSG se ha observado que alteraciones en los medios de cultivo pueden generar cambios bruscos en las características de los aislamientos.

El uso de reacciones bioquímicas y pruebas fisiológicas para indicar la presencia de ciertos metabolitos fue por largo tiempo una práctica común en la sistemática de *Phoma* sp. La aplicación de reactivos alcalinos (KOH, NaOH) en cultivos frescos todavía se usa, ya que puede cambiar el color de los metabolitos y pigmentos dependientes del pH. Además, el análisis bioquímico de cristales dendríticos formados en cultivos más antiguos, se puede utilizar para la identificación de una cepa hasta el nivel de especie (Aveskamp et al., 2008).

8.10 Enfoques basados en el ADN en la taxonomía de *Phoma* sp.

Los avances tecnológicos basados en identificaciones hasta nivel de especie han representado una excelente herramienta para los taxónomos de *Phoma* sp. Es importante mencionar que, aun existiendo este tipo de tecnología, se requiere de una alta experiencia en la identificación morfológica de este género, debido a que muchos de los aislamientos reportados en bases de datos (secuencias de nucleótidos) están almacenados incorrectamente.

Como resultado, hasta el año 2003 casi una quinta parte del número total de cepas de *Phoma* sp., cuyas secuencias se enviaron a bases de datos de secuencias públicas como Genbank, se identificaron incorrectamente. Sin embargo, esta tendencia no es exclusiva de *Phoma* sp., ya que este porcentaje aumenta lentamente a lo largo de los años, y para 2006, cerca del 27% del total de secuencias fúngicas públicas se derivaron de cepas identificadas de forma errada (Aveskamp et al., 2008).

Adicionalmente, es importante mencionar que aun contando con una alta experiencia en la identificación del género *Phoma* sp. utilizando herramientas convencionales, y aun pudiendo llegar hasta nivel de especie, en casos específicos como el de *P. exigua*, su identificación se vuelve compleja ya que existen al menos 11 variedades presentes en esta especie (Aveskamp et al., 2008). En el 2002 utilizando datos AFLP, mostraron una varianza ampliamente distribuida dentro de *P. exigua* var. *exigua*. Las variantes nuevas y sin nombre de este taxón parecen representar algunos patógenos graves, como un patógeno descubierto recientemente en la lechuga (Aveskamp et al., 2008).

La existencia de este tipo de complejidades en el interior de una especie, establece un límite para la identificación morfológica, haciéndose necesario la implementación de metodologías de diagnóstico moleculares y de esta manera complementar el proceso de identificación fitosanitaria en condiciones de laboratorio.

8.11 Número de especies reportadas en el género *Phoma* sp.

Utilizando los criterios poco claros de Saccardo, inicialmente se describieron 638 taxones en 1884. Y durante el Siglo XX esa cantidad aumentó a más de 2800. Hasta el año 2005 se almacenaron en el MycoBank más de 3200 accesiones pertenecientes al género *Phoma* sp. La razón por la cual el número de especies descritas se elevó a ese número es debido a la práctica común de los taxónomos de asociar la nomenclatura con el hospedero, combinado con la escasez de caracteres morfológicos y una alta variabilidad en las características observadas en los diferentes medios de cultivo (Aveskamp et al., 2010).

Basándose en nuevos métodos de identificación Boerema et al., en el 2004 realizó una revisión detallada del género y publicó un manual de identificación el cual describe 223 taxa específicos e intra-específicos. Los taxa descritos en este manual son individuos causantes de enfermedades en

plantas y algunos principalmente saprofitos (Aveskamp et al., 2008). Sin embargo, esto es tan solo la punta del iceberg ya que por ejemplo en el año 2010 solo el 40% de las especies de herbario mencionadas en la literatura, habían sido estudiadas correctamente (Aveskamp et al., 2010).

A pesar de que este manual bastante útil está basado en caracteres taxonómicos, existen taxones intraespecíficos los cuales al día de hoy se encuentran en discusión y un ejemplo de ellos es *Phoma multirostrata* que incluye las variedades: *multirostrata*, *microspora* y *macrospora*, las cuales solo pueden distinguirse por la longitud de sus conidias, provocando que varios autores actualmente no acepten la existencia de dichas variedades. Es importante mencionar que ubicar a un individuo dentro de un taxón intra-específico basándose en el tamaño de sus conidias se puede prestar para errores, ya que pequeñas variaciones en la preparación de los medios de cultivo, utilización de los mismos y las condiciones de incubación; pueden generar importantes cambios desde el punto de vista morfológico, limitando el proceso de diagnóstico.

Solo 2000 de los aproximadamente 5000 especímenes de herbario existentes han sido estudiados por Boerema y sus compañeros de trabajo durante los últimos 45 años, y aunque muchos de ellos podrían ser re combinados en otras especies, el número total de taxones de *Phoma* sp. enumerados en este trabajo es probablemente incompleto (Aveskamp et al., 2008).

Del mismo modo que el fenotipo *in vivo* puede depender de la composición del sustrato, la alta variación intraespecífica en el cultivo es el tipo y el pH de los medios utilizados, así como la temperatura de crecimiento. Esto puede haber influido en la forma y el tamaño de los picnidios, conidios y clamidosporas, la tasa de crecimiento, la pigmentación y el color de la colonia en muchos estudios descriptivos (Aveskamp, 2008).

El estado de nuestro conocimiento de la sistemática del género no está mucho más avanzado que en el sistema sacardoano. Una idea del trabajo descriptivo que aún debe llevarse a cabo se ve en el estudio de 40 años de Boerema y compañeros de trabajo. De los 223 taxones que aceptaron, 110 (casi el 50%) se recombinaron de otros taxones o se describieron como nuevos. Como hasta ahora solo se ha re-examinado el 40% de las especies de herbario, esto indica cuántos años de trabajo taxonómico pueden quedar por delante (Aveskamp, 2008).

8.12 Futuro de las investigaciones basadas en la taxonomía de *Phoma* sp.

Actualmente un concepto definido y los límites que lo diferencian de otros géneros morfológicamente similares se encuentran en debate y reclasificación constante, haciéndose necesario nuevos estudios que involucren los materiales tipo, así como los materiales de referencia disponibles y sus géneros relacionados. Los aislamientos disponibles actualmente en las colecciones nacionales e internacionales requieren de un esfuerzo conjunto para ser incluidas dentro de un extenso estudio que involucre la caracterización taxonómica, así como análisis filogenéticos, con el fin de obtener una mejor comprensión del género y sus respectivas especies y de esta manera lograr definir un concepto genérico bastante sólido.

Es importante dilucidar cómo ocurrió la especiación de este género con el fin de evitar la presencia de taxones intra-específicos basados en caracteres morfológicos. A nivel de especie es imperativo realizar investigaciones sobre complejos de especies presente en nichos específicos, teniendo en cuenta que es posible obtener aislamientos filogenéticamente distintos, pero morfológicamente parecidos y ser caracterizados erróneamente como una misma especie. Actualmente esto es lo que se está presentando en el género *Phoma* sp., generando la presencia de subclasificaciones en algunas de sus secciones, como se ha mencionado anteriormente.

También existe la posibilidad de que ocurra el caso contrario, en donde aislamientos morfológicamente diferentes hayan evolucionado recientemente a partir de un ancestro en común. Por lo anterior, uno de los principales desafíos a futuro será comprender cómo se produce la especiación en el género *Phoma* sp.

Uno de los grandes retos a nivel mundial y principalmente para los fitopatólogos relacionados con cultivos comerciales y bancos de germoplasma, será el desarrollar un sistema taxonómico altamente robusto e integral que proporcione identificaciones rápidas con el fin de detectar aquellas especies cuarentenarias y estas puedan ser claramente distinguidas de las especies saprófitas y oportunistas, principalmente en los puertos de importación y controles fronterizos.

Como retos adicionales es necesario estimular a nivel investigativo el desarrollo de herramientas de identificación polifásica (Johnson, 2014), teniendo como base una colección de cepas altamente diversa y de esta manera ayudar a la adecuada identificación de los aislamientos. Una de las propuestas

más llamativas actualmente y que muestra ser altamente prometedora es el uso de códigos de barra de ADN y el uso estandarizado de microcódigos (Xu, 2016). Esta iniciativa se basa principalmente en el uso de secuencias cortas de nucleótidos específica en las especies de interés.

Con base en todo lo anterior es posible asegurar que al desarrollar un sistema eficiente de identificación a nivel de especie, este podría mejorar significativamente la capacidad para controlar y manejar enfermedades causadas por el género *Phoma* sp., así como monitorear los patrones espaciales y temporales de las distribuciones y migraciones de individuos pertenecientes al género a nivel mundial.

8.13 Complejidades de la especie *Phoma exigua*

P. exigua se encuentra ubicado dentro de la sección *Phyllostictoides* la cual fue introducida por primera vez en el año de 1990 por el botánico y micólogo neerlandés Antonius Van der Aa y posteriormente el también micólogo neerlandés Gerhard Boerema en 1997 validó formalmente la “Sección *Phyllostictoides*” (Van der Aa et al., 2000).

Los individuos pertenecientes a esta sección producen picnidios de paredes delgadas, pseudoparenquimatosas, glabros, aunque a veces se observan acompañados de crecimientos o proyecciones hifales. Poseen una sola apertura u ostiolo para la liberación de las conidias sin embargo en muchos casos estos permanecen totalmente cerrados durante mucho tiempo.

Generalmente producen conidias sin septos en condiciones *in vitro* y en condiciones *in vivo* en las conidias más grandes es posible observar un proceso de tabicación secundario produciendo células con presencia de un septo medial. El porcentaje de conidias septadas está determinado por las condiciones ambientales y el rango pueden variar ampliamente, llegando a un 95% de septación; esto no ocurre en condiciones controladas ya que la mayoría de las conidias producidas *in vitro* son aseptadas, sin embargo, la septación se puede presentar en pequeños números.

Tal y como se presentó en la Tabla 1, los individuos presentan clamidosporas unicelulares, en caso de que las produzcan. Estas pueden presentarse aisladas, agrupadas o en complejos.

La gran mayoría de los individuos pertenecientes a esta sección son anamorfos del género *Didymella* Sacc. y la especie lectotipo de esta sección es *P. exigua* var. *exigua*.

8.14 *Nomenclatura actual y reubicación taxonómica de Phoma exigua*

8.14.1 *Sinonimias*

Phyllosticta sambuci Desm., Anns Sci. Nat., Bot., sér. 3 8: 14 (1847)

P. exigua Desm., Anns Sci. Nat., Bot., sér. 3 11(2): 282 (1849)

Ascochyta phaseolorum Sacc., Michelia 1(no. 2): 164 (1878)

Phoma exigua Sacc., Michelia 1(no. 5): 525 (1879)

Ascochyta nicotianae Pass., Atti Soc. Crittogam. Ital. 3(1): 14 (1881)

Ascochyta viburni Roum. ex Sacc., Syll. fung. (Abellini) 3: 387 (1884)

Phyllosticta hydrangeae Ellis & Everh., J. Mycol. 5(3): 145 (1889)

Phyllosticta forsythiae Sacc., Fungi italica autogr. del. 1-4: tab. 87 (1877)

Ascochyta coffeae Henn., Hedwigia 41: 307 (1902)

Phomopsis perexigua Traverso, Fl. ital. crypt. (Florence) 2(1): 229 (1906)

Ascochyta forsythiae (Sacc.) Höhn., Verh. Naturwiss. Vereins Hamburg, ser. 3 47: 36 (1909)

Phyllosticta hydrangeae var. *europaea* Passal., Pilze der zweiten deutschen Nordpolfahrt 1869-70 (Leipzig) 1: 5 (1926)

Ascochyta heteromorpha (Schulzer & Sacc.) Curzi, Boll. R. Staz. Patalog. Veget. Roma 12(3): 380 (1932)

Ascochyta hydrangeae (Ellis & Everh.) Aksel, Trudy bot. Inst. Akad. Nauk SSSR. Pl. Crypt. 11: 83 (1956)

P. exigua var. *solanicola* (Prill. & Delacr.) Popkova, Malikova & Kovaleva, (1973)

Phoma viburni (Roum. ex Sacc.) Boerema & M.J. Griffin, Trans. Br. mycol. Soc. 63(1): 110 (1974)

Phoma herbarum f. *humuli* Sacc., Syll. fung. (Abellini) 2: 133 (1883)

Phoma heteromorpha Schulzer & Sacc., Revue mycol., Toulouse 6(no. 22): 74 (1884)

Phoma perexigua Sacc., Syll. fung. (Abellini) 3: 123 (1884)

P. exigua var. *heteromorpha* (Schulzer & Sacc.) Noordel. & Boerema, Jaarb. plziektenk. Dienst.: 109 (1988) [1987]

Phoma solanicola Prill. & Delacr., Bull. Soc. mycol. Fr. 6(1): 142 (1890)

P. exigua var. *capsici* L.Z. Liang, Acta microbiol. sin. 31(2): 161 (1991)

P. exigua var. *viburni* (Roum. ex Sacc.) Boerema, J. Phytopath. 146(8-9): 414 (1998)

B. exigua var. *viburni* (Roum. ex Sacc.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, in Aveskamp, Gruyter, Woudenberg, Verkley & Crous, Stud. Mycol. 65: 39 (2010)

B. exigua var. *heteromorpha* (Schulzer & Sacc.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, in Aveskamp, Gruyter, Woudenberg, Verkley & Crous, Stud. Mycol. 65: 38 (2010)

B. exigua var. *forsythiae* (Sacc.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, in Aveskamp, Gruyter, Woudenberg, Verkley & Crous, Stud. Mycol. 65: 37 (2010)

B. exigua var. *coffeeae* (Henn.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, in Aveskamp, Gruyter, Woudenberg, Verkley & Crous, Stud. Mycol. 65: 37 (2010)

La sinonimia anterior fue tomada del repositorio micológico de indexación internacional “*Index Fungorum*”. Recuperado de: <http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=515624>.

P. exigua es un hongo plurívoro muy común en Europa y Asia, aunque también ha sido reportado en Australia y las Américas. Este hongo ha sido frecuentemente renombrado como una especie desde mediados del Siglo XIX y puesto en los géneros *Phoma* sp., *Phyllosticta* sp. y *Ascochyta* sp., basándose en la especificidad con respecto al hospedero en el que ha sido hallado. Boerema et al, en el 2004 basándose en estudios utilizando AFLP’s estableció la sinonimia de esta especie, así como una contribución taxonómica de su nomenclatura, con el fin de esclarecer su correcta identificación.

De acuerdo a Van der Aa et al, 2000 *P. exigua* var. *exigua* ha sido descrito, redefinido y relacionado con más de 160 sinonimias, basándose principalmente en sus caracteres morfológicos:

***Ascochyta* sp. (9):** *A. adzamethica*, *A. boydii*, *A. carpathica* f. *caulivora*, *A. cynarae*, *A. dahliicola*, *A. glechomae*, *A. lappae*, *A. pirina* y *A. potentillarum*.

***Diplodina* sp. (1):** *Diplodina cynarae*.

***Phoma* sp. (4):** *P. catalpicola*, *P. heteromorphospora*, *P. niesslii* y *P. westendorpii*.

***Phyllosticta* sp. (155):** *P. abutilonis*, *P. aconitina*, *P. actinidiae*, *P. adenostylis*, *P. aecidiicola*, *P. alismatis*, *P. alliicola*, *P. aloides*, *P. alpina*, *P. alternantherae*, *P. anagallidis*, *P. antennariae*, *P. arborea*, *P. ariaefoliae* f. *ulmifolia*, *P. aricola*, *P. armeniaca*, *P. balcánica*, *P. ballotaecola*, *P. balsaminae*, *P. belgradensis*, *P. bellidicola*, *P. bellidis*, *P. berlesiana*, *P. bletiae*, *P. bonanseana*, *P. calamintae*, *P. calthae*, *P. calycanthi*, *P. canescens*, *P. capparidis*, *P. capsulicola*, *P. cardaminis-amarae*, *P. carpathica*, *P. carthami*, *P. caucásica*, *P. caucasicai*, *P. celosiae*, *P. chenopodii*, *P. cinchonae*, *P. circaeae*, *P. coriandri*, *P. crinodendri*, *P. crotalariae*, *P. cynarae*, *P. dahliicola*, *P. datiscae*, *P. daturae*, *P. daturicola*, *P. desertorum*, *P. dircae*, *P. doellingeriae*, *P. elettariae*, *P. erigerontis*, *P. erodii*, *P. erythraeae*, *P. eupatorii*, *P. eupatorina*, *P. falcata*, *P. fatiscens*, *P. filipendulae*, *P. filipendulina*, *P. filipendulina* var. *ulmariae*, *P. gaillardiae*, *P. galinsogae*, *P. gei*, *P. gerberae*, *P. gillesii*, *P. glechomae*, *P. gomphrenae*, *P. gueldenstaedtia*, *P. halophila*, *P. helianthemicola*, *P. heterospora*, *P. hieracii*, *P. hoveniae*, *P. hualtata*, *P. hydrocotyles*, *P. hypericicola*, *P. inulae*, *P. ivaecola*, *P. juliae*, *P. lamsanae*, *P. lappae*, *P. lychnidis*, *P. lythri*, *P. macrospora*, *P. magnolia*, *P. magnoliae*, *P. melampyri*, *P. mentzeliae*, *P. mercurialicola*, *P. mimuli*, *P. molluginis*, *P. monardae*, *P. monardicola*, *P. mucunae*, *P. myosotidicola*, *P. nupharis*, *P. nymphaeacea*, *P. orontii*, *P. otites*, *P. pentastemonis*, *P. pentastemonis* f. *pentastemonis*, *P. pentastemonis* var. *major*, *P. pentastemonis* var. *pentastemonis-azurei*, *P. pentastemonitis*, *P. petasitidis*, *P. phlomidis*, *P. pimpinellae*, *P. pogostemonis*, *P. polemonii*, *P. potamia*, *P. pucciniophila*, *P. pucciniospila*, *P. pygmaea*, *P. rosae-sinensis*, *P. sagittifoliae*, *P. salviae*, *P. scrophulariae-bosniaca*, *P. scrophulariaecola*, *P. senecionicola*, *P. sesami*, *P. sinapi*, *P. sisymbrii*, *P. solani*, *P. sonchi*, *P. sórdida*, *P. spaethiana*, *P. stachidis* var. *annua*, *P. stachidis* var. *arvensis*, *P. staticis-gmelini*, *P. stigmaphylli*, *P. stratiotis*, *P. strelitziaeicola* var. *major*, *P. suaedae*, *P. taraxaci*, *P. tassiana*, *P. telekiae*, *P. torilidis*, *P. tropaeoli*, *P. valerianae*, *P. verbasci*, *P. vernonida*, *P. westendorpii*, *P. xanthosomatis*, *P. zahlbruckneri*, *P. zambiensis*.

La extensa sinonimia puede explicarse por el carácter plurívoro ilimitado del hongo y su extrema variabilidad en tamaño y tabicación de conidios. Son notables los muchos nombres indicativos de “hospedero específico”, anteriormente descritos en el género *Phyllosticta*. Como productor de citocalasinas A y B, el hongo se conoció inicialmente como “*Phoma stam* S 298” (Van der Aa et al., 2000).

La principal causa que provocó en el pasado, el traslado del *P. exigua* de una sinonimia a otra fue la gran variabilidad de se presenta en el tamaño y septación de las conidias en condiciones *in vivo*, en contraste con la septación observada en condiciones *in vitro*. Esto debido a que las diferenciaciones de los caracteres taxonómicos de cepas asiladas de hospederos específicos solo es posible realizarlas en condiciones de laboratorio y recordemos que el porcentaje de septación observado en las dos condiciones (*in vivo* – *in vitro*) varía significativamente. En la tabla 3 se resumen las características morfológicas de las colonias en medio de Agar Avena (OA), Agar Extracto de Malta (MA) y Agar Cereza (CA).

Tabla 3. Características morfológicas observadas en *P. exigua* var. *exigua* en medios de cultivo OA, MA y CA.

	Agar Avena (OA)	Agar extracto de Malta (MA)	Agar Cereza (CA)
Tasa de crecimiento (mm)	(25-)50-85	(25-)40-75	35-70
Margen	Irregular, lobulado	Irregular, lobulado	Lobulado
Micelio	Aéreo, flocoso.	Aéreo, flocoso.	Aéreo.
Color	Blanco a gris oliváceo pálido/gris oliváceo. Generalmente	Gris oliváceo a verde opaco/ negro oliváceo. A menudo con parches rojizos.	Gris opaco a negro oliváceo. A menudo con manchas

	incolora hacia el margen.	Generalmente incolora hacia el margen.	canela a gris sepia.
Picnidio	Globosos, subglobosos, irregulares, solitarios, agregados, glabros. Pared picnidial 1-3 capas externas con células isodiamétricas		
Diámetro picnidial	100 – 200 μm		
Ostiolo	1 a 2 papilados, revestido de células papiladas subhialinas.		
Color del picnidio	Oliváceos a oliváceos negros.		
Exudado conidial	Blanco a amarillento, rosado a salmón, rosado vinoso.		
Células conidiogénicas	3-8 x 3-8 μm . Globosas, fiálides ampuliformes, engrosamiento periclinal del locus conidiogénico.		
Dimensión conidial	Aseptada: (2.5-) 4-7 (-12) x 2-3.5 μm (in vitro). Septada: 7.5-14.0 (-16.0) x 2.5-4.0 (-6.0) μm (in vivo)		
Conidia	Subglobosa, elipsoidales, oblongas, alantoides, generalmente con presencia de gúmulas.		
Clamidosporas	Ausentes (suele observarse la presencia de células hinchadas constreñidas en los septos)		
Cristales	Ausentes		
Prueba de NaOH	Positivo	Positivo	N/A
Antibiótico E	Presente	Presente	Presente

Fuente: (Van der Aa et al., 2000).

Con base en los estudios realizados por Van der Aa en el 2000, se presenta en la figura 16 un esquema de una colonia de *P. exigua* var. *exigua* tras una incubación de 14 días aproximadamente.

Los esquemas presentados fueron obtenidos de observaciones realizadas utilizando microscopio electrónico. En la figura 22 D-F es claro apreciar que ocurre un crecimiento anular desde la pared lateral de la conidia, dejando al final un poro (p) en el área central. Básicamente el tabique consiste en una laminilla media llamada “placa septal” (sp.) en ambos casos están cubiertas con paredes adheridas a la pared lateral del conidio (Van der Aa et al., 2000).

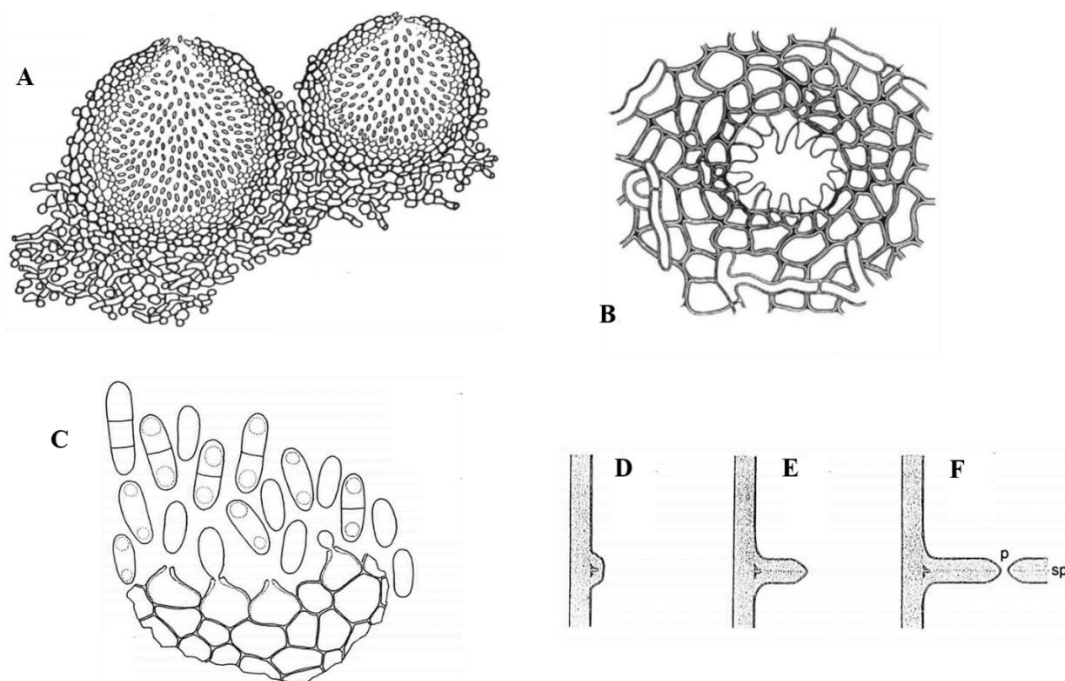


Figura 22. Esquema de *P. exigua* var. *exigua* (Sección *Phyllostictoides*). Corte vertical del picnidio y micelio subsecuente (A). Vista superficial de un ostiolo, revestido internamente con células hialinas papiladas (B). Células conidiogénicas y conidios (C). Representación esquemática de la tabicación secundaria de los conidios. Ocurre como un crecimiento anular hacia el interior de la pared lateral, dejando un poro (**p**) en el centro. El tabique consta de una laminilla media, la placa septal (**sp**), a ambos lados cubierta con capas de pared que a cierta distancia están "adheridas" a la pared lateral del conidio. (D-F). Tomado de: (Van der Aa et al., 2000).

Las cepas representativas de *P. exigua* var. *exigua* están conservadas en el Instituto de Biodiversidad Fúngica Westerdijk bajos los códigos: CBS 431.74, CBS 101150 y CBS 101155.

Aveskamp en el 2010 realizó un estudio con el fin de reorganizar y delimitar correctamente al género *Phoma* sp. desde un punto de vista evolutivo mediante el análisis de secuencias multilocus, como resultado de este estudio demostró que dicho género es altamente polifilético. En esta investigación se analizaron más 206 taxones los cuales tenían una alta afinidad con el género *Phoma* sp.

El principal objetivo de este estudio fue llegar a un consenso sobre la circunscripción del género *Phoma* sp. Una definición modificada del género no solo es útil en taxonomía, sino que también será de interés para los oficiales de cuarentena de plantas. Sin embargo, las asociaciones teleomorfas de *Phoma* sp. aún son inciertas, y se intentó arrojar luz sobre el estado sexual de este género. Se

incluyeron especies que representan todas las secciones de *Phoma* y las secuencias de ADN se compararon con las de otras especies en los Pleosporales (Aveskamp et al., 2010).

Como resultado de esa investigación *P. exigua* fue renombrado, siendo su nombre actual el siguiente:

Boeremia exigua (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, in Aveskamp, Gruyter, Woudenberg, Verkley & Crous, Stud. Mycol. 65: 37 (2010).

Para lograr este objetivo de delimitación se aplicó la combinación de cuatro loci. Dos de ellos altamente reconocidos por la capacidad de resolver filogenias por encima del nivel familiar que son la subunidad mayor (LSU, por sus siglas en inglés) y la subunidad menor (SSU) del ADN ribosómico. Los otros dos brindaron resolución a nivel de especie e incluso por debajo, los cuales fueron las regiones ITS y parte del gen de la β -tubulina (Aveskamp et al., 2010).

En micología tradicional es usual utilizar el nombre genérico de forma conveniente y esto es lo que ha ocurrido con el género *Phoma* sp. Las especies han sido definidas y clasificadas desde un sistema netamente basado en la morfología y no se estableció este género como una entidad filogenética. Esto causa un gran conflicto desde diferentes puntos de vista, ya que los micólogos hacen un gran esfuerzo por clasificar a los individuos de manera natural, sin embargo, está el interrogante si se deben mantener los géneros basados en las formas o ir gradualmente cambiando la visión de investigadores y personal técnico en campo hacia las nuevas clasificaciones más naturales, es decir, fusionando los datos filogenéticos con los datos morfológicos.

P. exigua es un claro ejemplo de las complejidades que envuelve la micología tradicional y cómo un género clasificado solo en los caracteres taxonómicos, va perdiendo su identidad a medida que se van desarrollando nuevas metodologías que esclarecen las relaciones naturales de los individuos.

Para efectos prácticos y como una manera de pedagógica de ir asumiendo la reciente nomenclatura, de aquí en adelante nos referiremos a *P. exigua* como *B. exigua* de manera intercalada. A continuación, se muestra información relevante del nuevo clado *Boeremia*.

***Boeremia* Aveskamp, Gruyter & Verkley, gen. nov.:** este grupo representa a las especies morfológicamente similares que se conocen actualmente como *P. exigua*, es un clado bien definido (BPP = 1.00, RBS = 100%) y comprende todos los taxones reconocidos como variedades separadas de *P. exigua* por Abeln et al., en el 2002. (Aveskamp et al., 2010).

Las especies y variedades de este clado se diferencian de otros taxones de *Phoma* sp. en función de la morfología de los ostiolos. A diferencia de otras especies que producen ostiolos de líneas suaves, los taxones incluidos en este clado tienen células hialinas distintas que recubren sus aberturas ostiolares (Fig. 23).

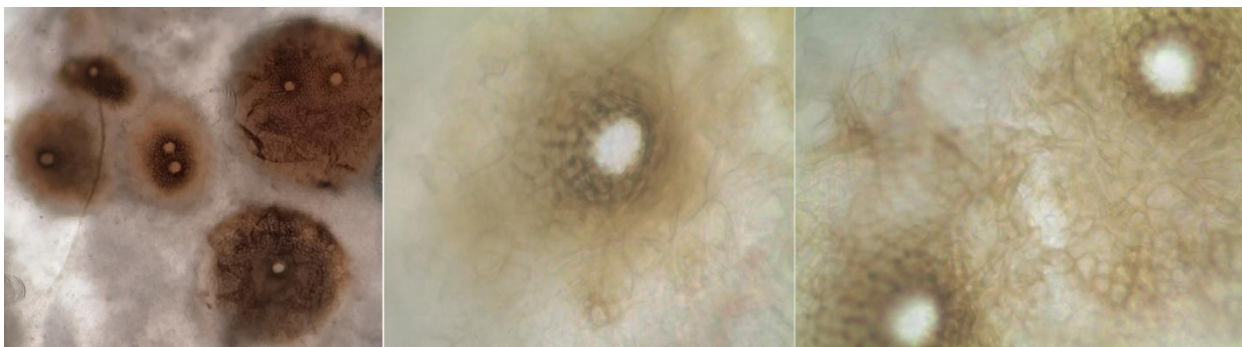


Figura 23. Configuración ostiolar observado en individuos pertenecientes al género *Boeremia* gen. nov. Fuente propia.

El conidiomata picnidial es variable en forma y tamaño, generalmente globosos o subglobosos, glabros o con pocas excrescencias miceliales, pueden crecer en la superficie del agar o sumergidos, solitarios o agregados. Pueden medir en entre 75 a 370 μm de diámetro. 1 - 2 ostiolos (-3), no papilados o papilados, revestidos internamente con células hialinas papiladas cuando han alcanzado su mayor grado de madurez. Pared picnidial pseudoparenquimatosa, la cual está compuesta de 2 a 8 capas de células, de las cuales de 1 a 3 más externas se encuentran pigmentadas de color marrón. Las células conidiogénicas son fialídicas, hialinas, simples, lisas, ampuliformes a doliformes (3-7,5 x 3-6,5 μm). Conidias de forma variable, hialinas de paredes delgadas, lisas, generalmente aseptadas (2,5-12 x 2-4 μm), sin embargo, es posible encontrar conidias con 1 a 2 septos (15 x 5 μm). Pseudotecio rara vez registrado en una especie *in vivo*, subgloboso, hasta 300 μm de diámetro. Asca cilíndrica o subclavada

(50-95 x 6-10 μm), siempre con 8 ascosporas biseriadas. Ascosporas elipsoides, uniseptadas (12-18 x 5-6 μm).

Especie tipo: *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley

Boeremia exigua var. *exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, comb. nov. MycoBank MB515624. Basionym: *P. exigua* Desm., Ann. Sci. Nat. Bot. III 11: 282. 1849. (Aveskamp et al., 2010).

8.15 Metodologías empleadas para la identificación del complejo *Phoma* sp.

A través de los años las investigaciones taxonómicas realizadas por los micólogos con el fin de hallar una manera rápida y adecuada de identificar y diagnosticar a individuos pertenecientes al complejo *P. exigua*, han experimentado con una variedad de metodologías pasando por técnicas de identificación morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, hasta llegar a los tiempos actuales mediante el uso de herramientas moleculares. A continuación, se realizará un breve repaso de algunas de las metodologías usadas en la identificación de este complejo a través del tiempo.

8.15.1 Metabolito “E”

Una de las prácticas más usadas para la identificación de individuos pertenecientes al complejo *P. exigua* se encuentra el uso de la técnica denominada: Producción de Metabolito “E”. esta técnica de carácter bioquímico, se caracteriza por la producción de un metabolito incoloro “E” (producido por *P. exigua*), el cual se puede derivar a un pigmento “ α ” y un pigmento “ β ”

A pesar que la presencia de un metabolito en particular no se limita a una especie en particular, se ha demostrado mediante comparaciones con otras cepas que *P. exigua* que el metabolito “E” solo es revelado por cepas pertenecientes a este hongo, razón por la cual se cree que esta reacción de oxidación es un valioso carácter taxonómico (Boerema & Höweler, 1967).

La reacción es la siguiente: $(E + O_2 \longrightarrow (\alpha \leftrightarrow \beta))$; en condiciones alcalinas (NaOH)

Se ha demostrado en ejercicios comparativos que la producción del Metabolito “E” es más abundante en Agar Malta. En agar cereza la producción es mucho menor y en Agar Avena es bastante escaso. A un pH más bajo, parece haber más sustancia “E” en el medio que a pH más altos y adicionalmente se encontró que en presencia de luz hay mayor producción de este metabolito. En presencia de los productos de oxidación de la sustancia “E”, los pigmentos “ α ” y “ β ” actúan como indicadores de pH. Así, el pigmento “ α ” es rojo púrpura a pH <10,5 y azul verdoso a pH >12,5. El pigmento “ β ” es amarillo a pH <3,5 y rojo a pH >5,5 (Boerema & Höweler, 1967).

El proceso es relativamente sencillo y fácil de revelar en cultivos de *P. exigua* y sus variedades la oxidación del Metabolito “E” se produce al agregar al medio una gota de álcali, normalmente se usa NaOH y la producción del pigmento inicia casi que de inmediato en el lugar donde fue ubicada la gota. Esto es posible observarse gracias a la presencia de un ambiente alcalino en el cual se presenta un viraje de color a azul-verdoso el cual se va oscureciendo a medida que transcurre el tiempo. Normalmente se evidencia una coloración más intensa hacia el borde de la gota (donde el suministro de oxígeno es mayor). Posteriormente el pigmento “ α ” pasa a “ β ” el cual es rojizo en condiciones alcalinas. El color rojo aparece primero en el borde de la gota y en el centro de la gota hay al principio una mezcla de “ α ” (verde-azulado) y “ β ” (rojizo). El color, por supuesto, también está influenciado por el color natural del medio de agar, que es amarillo en agar malta y rojo en agar cereza (Boerema & Höweler, 1967).

8.15.2 Cristalización de los pigmentos de antraquinona

Adicionalmente al análisis de la presencia del Metabolito “E” para la diferenciación de las variedades pertenecientes a *P. exigua* Tichelaar, (1974) realizó el reporte sobre el efecto producido por el fungicida Tiofanato-metilo (Dimetil 4,4'-(o-fenilen)bis(3-tioalofanato)) en condiciones de laboratorio, el cual produce la cristalización de los pigmentos de antraquinona (cristales de color amarillo) al comparar las variedades *exigua* y *foveata*.

Al igual que la prueba bioquímica con el uso de NaOH, el proceso el Tiofanato-metilo es relativamente sencillo. Se adicionan 25 ppm de fungicida en el Agar Malta fundido (extracto de malta al 1%) después de dejar enfriar a 50°C no solo aceleró la formación de los cristales amarillos, sino que también

aumentó su abundancia, produciendo así una diferencia notable entre las colonias de las dos variedades de *P. exigua* en una semana.

8.15.3 Detección de la producción de crisofanol

Mosch & Mooi (1975), reportaron la presencia de crisofanol (ácido crisofánico o metil-antrachinona), un derivado de la antraquinona producido por *P. exigua* var. *foveata* en medio PDA (papa, dextrosa, agar) usando la siguiente metodología: se homogenizó el micelio junto con el medio de cultivo y se hizo la extracción mediante cloroformo. Después de evaporación a 55°C, el extracto obtenido fue esparcido sobre láminas de gel de sílice y fue posteriormente cromatografiado. Se utilizó una mezcla de tolueno y acetona (0,95:5 v/v) como solvente. Utilizando una luz con longitud de onda de 366nm, fue posible observar varios componentes; donde el componente más conspicuo tuvo un valor de Rf de 0,79 (factor de retardo – Rf). Este valor coincidió con uno de los principales componentes de una presentación comercial de crisofanol.

Con el valor Rf 0,79 hallado se tomaban tejidos vegetales infectados recién cortados, en los cuales se tenía sospecha de la presencia de *P. exigua* y eran ubicados sobre una hoja de gel en sílice (presionando firmemente) y se cromatografiaba como se explicó anteriormente. Siendo una técnica poco compleja pero bastante limitada ya que solo servía para distinguir entre las variedades *exigua* y *foveata*.

8.15.4 Detección de la producción de liasas

Charya & Reddy (1983), informaron sobre la capacidad de *P. exigua* de producir enzimas celulolíticas y pectolíticas denominadas liasas. Con el objetivo de crear una metodología para la identificación de este hongo fitopatógeno, propusieron caracterizar este tipo de enzimas, en cepas halladas afectando semillas de *Vigna radiata*. Para su evaluación las cepas de *P. exigua* debían ser mantenidas en medio de cultivo Asthana-Hawker (AHM), Czapek (CZA), Peptona-Glucosa y medio harina de mung (*Vigna radiata*) durante un periodo máximo de 16 días, a una temperatura entre 25-29°C. De acuerdo con los resultados obtenidos *P. exigua* secreta pectato-liasas en diferentes concentraciones dependiendo del medio, encontrándose que la temperatura óptima para la producción de este tipo de enzimas se da entre

los 25-30°C y el pH óptimo entre 6-10. Respecto a la producción de pectina-liasas, la concentración fue similar en todos los medios recomendados y la temperatura óptima fue la misma que para las pectato-liasas. El pH óptimo de 9 y por debajo de pH 7 no hubo producción de la enzima. A pesar de obtener resultados contundentes este tipo de metodología no es lo suficientemente robusta para trabajos de diagnóstico. Razón por lo cual esta técnica no fue ampliamente empleada ya que los rangos de datos encontrados fueron similares a los obtenidos con otros hongos fitopatógenos como: *Penicillium citrinum*, *Verticillium dahliae*, *Helminthosporium tetramera*, entre otros.

8.15.5 Técnica inmunoenzimática ELISA

Como una medida para el rápido diagnóstico de la enfermedad de la gangrena de la papa causada por las variedades *foveata* y *exigua*, Aguelon & Dunez (1984) desarrollaron dos técnicas inmunoenzimáticas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) (Tipo Sándwich e Indirecta) mediante el uso de antisuero obtenido de conejos, los cuales fueron inyectados con soluciones proteicas provenientes de micelio de estas dos variedades. Las ELISAS desarrolladas demostraron ser adecuadas en la detección de *P. exigua* presente en diferentes tejidos (tubérculos, brotes y tallos), siendo la ELISA Indirecta la de mayor sensibilidad en comparación con la de tipo Sándwich. La desventaja presentada por estas técnicas fue la presencia de un nivel alto de reacciones inespecíficas con muestras de tubérculos y brotes. La reducción del nivel de estas reacciones se logró únicamente al diluir los extractos. Durante el desarrollo de las técnicas no se logró identificar el origen de estas reacciones inespecíficas, sin embargo, no se encontró evidencia suficiente que se debiesen a reacciones serológicas.

La ventaja de los antisueros usados en este ensayo es que proporcionan una herramienta muy simple, sensible y rápida para la detección de *Phoma* sp., pero no fue posible producir los anticuerpos específicos para las dos variedades, ya que estos reaccionaron con otras especies pertenecientes al género *Phoma* sp., razón por la cual los resultados obtenidos por los investigadores a la fecha siguen siendo poco claros y poco confiables. Los intentos de identificar y aislar un antígeno específico en extractos de proteínas de micelio no tuvieron éxito.

8.15.6 Espectrofotometría de masas (EM)

Desde el punto de vista morfológico los hongos *P. exigua* var. *exigua* y *P. exigua* var. *foveata* son indistinguibles. Weijman et al. (1984), describieron varias técnicas de espectrofotometría de masas como alternativas rápidas y eficientes para el diagnóstico de estos dos patógenos del cultivo de la papa. En el estudio se evaluaron las siguientes técnicas: Cromatografía de Capa Fina (TLC) generalmente usada para el monitoreo de reacciones, purificación de muestras y la identificación de compuestos y contaminantes en mezclas; Cromatografía gas-líquido (GLC) utilizada para la separación y caracterización de antraquinonas naturales; la Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), usada para identificar diferentes sustancias dentro de una muestra de prueba; espectrometría de masas por pirólisis (Py-MS) y la espectrometría de masas con sonda de inserción directa (DIP-MS). Para efectos prácticos en el uso de estas técnicas es necesario realizar la obtención de Pasibaquina (antraquinona fúngica) de las muestras a analizar, en este caso de las dos variedades de estudio (*foevata* y *exigua*). De acuerdo a las necesidades de cada técnica así mismo fue la preparación de las muestras para sus respectivos análisis y debido a la complejidad de los procedimientos no es práctico realizar la descripción de cada técnica en el presente documento.

Con base en los datos obtenidos se confirmó que la TLC es una técnica eficiente de bajo costo, sin embargo, la obtención de bandas de pasibaquina se altera a menudo debido al poder limitado al analizar extractos crudos. Las metodologías de EM como enfoques alternativos de diagnóstico son mucho más costosas que las convencionales, sin embargo, son mucho más rápidas y eficientes cuando se tiene estandarizado el manejo de las muestras ya que con estas técnicas no se requiere de grandes cantidades de micelio o tejido infectado. Las desventajas de estas técnicas se presentan principales con problemas de uso de los equipos debido a la necesidad de limpiezas frecuentes de las fuentes de iones utilizadas, las cuales se contaminan por componentes de baja volatilidad.

El método más prometedor para la identificación de estos patógenos fue la GC-MS, debido a su alta disponibilidad, especificidad e idoneidad para la automatización del proceso. Debido a que son técnicas que pueden adaptarse a sistemas computarizados, esto permite que el muestreo, análisis y generación de reportes se haga de una manera mucho más rápida y eficiente. Por tal razón estas metodologías deben ser analizadas con mayor detalle, principalmente en aquellas situaciones donde se maneje un gran volumen de muestras.

8.15.7 Utilización de medios de cultivo semi-selectivos

Basándose en características fisiológicas presentadas por las variedades *foveata* y *exigua*, Turkensteen (1987), desarrolló un medio selectivo conteniendo los siguientes ingredientes: 10 mg de rosa de Bengala, 40 mg de clorotalonil, 300 mg de metalaxil, 250 mg de sulfato de estreptomicina, 100 mg de sulfato de neomicina, 50 mg de cloruro de tetraciclina, 10 g de extracto de malta y 15 g de Agar Técnico No. 3.

El experimento se llevó a cabo sembrando en el medio semi-selectivo dos o más cepas de los hongos de interés con el propósito de comparar virajes de color, producidos en el medio. Una de las ventajas del uso de este medio de cultivo, se basa en que la producción de antraquinonas formadas por *P. exigua* var. *foveata* provoca la aparición de gran cantidad de cristales de color amarillo verdoso, siendo este fácilmente identificable, aun cuando haya crecimiento de la variedad *exigua* en la misma caja. Adicionalmente se observó la formación de líneas negras en medio de algunas colonias (normalmente estas dos variedades producen líneas de color violeta delimitando las colonias).

Normalmente las líneas negras aparecen al onceavo día de incubación sin desvanecerse (cuando las colonias comparadas han hecho contacto). En contraste con las líneas violetas que se observan al cuarto día de incubación (colonias sin contacto), las cuales se desvanecen al ser cubiertas por el hongo. A pesar de los hallazgos obtenidos no fue posible establecer una relación directa entre las variedades y la formación de estas líneas oscuras.

A la fecha y con base en la literatura consultada no se encuentra en el mercado un medio de cultivo selectivo o semi-selectivo para el diagnóstico de *P. exigua* (*B. exigua* nov.).

8.15.8 Desarrollo de protocolos para obtención de ADN fúngico

A partir de los 90's se dio inicio a investigaciones por parte de los micólogos para el desarrollo de herramientas relacionadas con la identificación molecular de hongos fitopatógenos con el objetivo de tener una mayor claridad acerca de sus relaciones filogenéticas. En este orden de ideas Möller et al. (1992), desarrollaron un protocolo para la obtención de ADN fúngico de alto peso molecular (requisito principal) con el fin de llevar a cabo investigaciones relacionadas con la sistemática de los hongos a

través de la amplificación de regiones genómicas definidas o de secuencias polimórficas (RAPDs, RFLPs), metodologías basadas en la técnica PCR.

Con el desarrollo de este protocolo abordaron algunos de los grandes inconvenientes en la obtención de ADN fúngico de buena calidad los cuales se basan en alta producción polisacáridos de algunos aislamientos, así en la obtención de cantidades insuficientes al extraer ADN proveniente de estructuras reproductivas o tejidos vegetales infectados.

Para este fin introdujeron la inactivación de proteínas mediante el uso de SDS (dodecilsulfato sódico) y Proteinasa K (inactivador de RNAsas y las DNAsas), precipitación de polisacáridos ácidos en Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) caliente en presencia de SDS y sales, así como una sola precipitación del ADN obtenido en isopropanol.

Este protocolo resultó bastante útil para el procesamiento de un alto número de muestras provenientes de varias especies fúngicas. Las concentraciones de ADN obtenido se encontraban en rangos entre los 50-50 kpb usando entre 30-60 mg de micelio liofilizado para la extracción.

8.15.9 Contribuciones taxonómicas para el diagnóstico basado en caracteres morfológicos

A la par de los avances tecnológicos los investigadores relacionados con el mundo de la micología no dejan de lado un aspecto muy importante en taxonómica tradicional y es el de desarrollar o crear claves taxonómicas mucho más detalladas con el fin de brindar herramientas de apoyo a los micólogos especializados en morfología.

Van der Aa et al. (2000) realizaron una descripción morfológica y una revisión de la nomenclatura de la *Sección Phyllostictoides* en la cual se encuentran incluidos todos los individuos de la forma *P. exigua*. Discutiendo la disposición taxonómica proporcionando una clave dicotómica basada principalmente en un índice hongo-hospedero, proponiendo dos variedades: *P. exigua* var. *forsythiae* (Sacc.) comb. nov. y *P. exigua* var. *noackiana* (Allesch.) comb. nov.

Adicionalmente se ofrecen datos importantes acerca de la sinonimia relacionada, lectotipo y datos sobre distribución y ecología. Este documento representa una herramienta importante para conocer las características morfológicas más relevantes en el estudio de *P. exigua* (*B. exigua* nov.) aportando datos

de las características presentadas por este hongo *in vivo* e *in vitro*. Es importante mencionar que la taxonomía subespecífica presentada en este documento estuvo respaldada por estudios usando AFLPs.

Posteriormente Boerema et al. (2004) desarrollaron un manual altamente descriptivo incluyendo figuras y descripciones de colonias de al menos 223 taxones específicos e intra-específicos dentro del género *Phoma* sp. Sacc. emend. Boerema & G.J. Bollen, incluyendo las más de 1000 sinonimias correspondientes dentro los celomicetos. Este manual representa una herramienta fundamental para el estudio y adiestramiento desde el punto de vista morfológico para aquellos investigadores interesados en realizar trabajos de sistemática y filogenia con hongos pertenecientes a este taxón.

8.15.10 Uso de marcadores moleculares

Uno de los mayores argumentos para el uso de caracteres moleculares es que son universales ya que existen genes en todos los genomas celulares (i.e. ribosomales), los cuales son una herramienta ideal para proveer información filogenética. A pesar de que los caracteres morfológicos poseen limitaciones con respecto a estudios filogenéticos son el complemento necesario para el desarrollo de marcadores moleculares los cuales son una herramienta necesaria en el campo de la biología evolutiva (Rentarúa, 2000).

En el (2000) MacDonald et al. desarrollaron una metodología mediante el uso de marcadores moleculares (RAPD y PCR-RFLP) para la diferenciación de molecular entre *P. exigua* var. *exigua* y la variedad *foveata*. Con el objetivo de hallar una banda de ADN polimórfico entre las dos variedades se analizaron 33 cebadores aleatorios en reacciones RAPD y los patrones obtenidos fueron característicos para cada patógeno. Esto permitió el diseño de una prueba PCR que permitió distinguir cada variedad. Los cebadores derivados del producto RADP generaron fragmentos de 474 pb y la posterior digestión con enzimas de restricción de las bandas amplificadas (PCR-RFLP) produjeron los patrones correspondientes para identificar cada patógeno.

Los RAPDs son marcadores que amplifican aleatoriamente fragmentos del ADN, normalmente son oligonucleótidos de aproximadamente 10 pares de bases de longitud, los cuales pueden ser complementarios en varios sitios del genoma. El polimorfismo de las bandas obtenidas en cada uno de los individuos obedece a cambios en la secuencia de nucleótidos en los lugares de acoplamiento

del oligonucleótido ya sea por delección o inserción de los fragmentos en estos sitios (Tiwari et al., 2013).

Una de las principales ventajas de los RAPD es su capacidad de amplificar regiones del ADN, tanto “codificantes” como las “no codificantes” y a comparación de los RFLPs y las isoenzimas, revelan niveles de mayor variación. No requieren conocimientos previos del genoma, así como la construcción o mantenimiento de librerías genómicas (contiene fragmentos de los ADN genómicos generados mediante la digestión parcial). No requiere pruebas radiactivas y el número de loci analizados es ilimitado (Rentarías, 2000).

Desventajas: 1) presencia de bandas erróneas (artefactos), 2) Reproducibilidad de los resultados, 3) comigración de las bandas, 4) alelos raros no son detectados o pueden ser malinterpretados, 5) poca información de los loci codominantes.

Los RFLPs revelan diferencias del ADN específicas, las cuales fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas) las cuales reconocen y cortan solamente una secuencia específica del ADN siempre y cuando estas no se encuentren metiladas (Rentarías, 2000).

El uso de esta herramienta en sistemática hongos demostró que solo pequeñas variaciones pueden ser observables a nivel poblacional al analizar ADN mitocondrial (mt-ADN) debido que en cada especie existe un alto grado de conservación. Esta técnica presenta como desventajas la necesidad de una gran manipulación y altos costos en los ensayos, los fragmentos obtenidos son representados un gran volumen dentro de una reacción simple; necesidad de aislar grandes cantidades de ADN cuando el genoma es grande (Martínez de la Parte, 2006).

Desde hace algunas décadas se ha trabajado arduamente en el desarrollo de estrategias para el diagnóstico de individuos y se han descrito técnicas para diferenciar de manera directa el material genético de los individuos, a través de patrones de bandas provenientes del ADN conocidas como “huellas genómicas o huellas de ADN”. Haciendo una semejanza, estos patrones de bandas corresponderían, por ejemplo, a los códigos de barras que identifican un producto comercial y en el caso de los seres humanos a sus huellas digitales, es decir, únicas para cada individuo; llevando a cabo una tipificación altamente precisa y única del organismo en estudio (Valadez-Moctezuma et al., 2001)

Una de las técnicas usadas para el diagnóstico rápido del complejo *Phoma* es el uso de Huellas digitales de amplificación de ADN (DAF) la cual se basa en la tecnología de la PCR generando un

perfil de amplificaciones arbitrarias (MAAP, por sus siglas en inglés) (Caetano-Anollés & Bassam, 1993).

Aveskamp et al. (2009b) puso a prueba esta técnica utilizando ADN proveniente de 42 cepas pertenecientes al complejo *P. exigua* usando cinco cebadores de mini-horquilla. Cada una de las huellas de ADN contenía de 1 a 13 bandas visibles entre 300 y 2000 bp.

Los cebadores mini-horquilla consisten en un bucle de ADN compuesto de siete u ocho nucleótidos y un núcleo arbitrario de tres a cinco nucleótidos de longitud. La estabilidad de estos cebadores oligonucleotídicos es bastante alta y con base en varias investigaciones han demostrado ser muy útiles en estimaciones de las relaciones genéticas incluyendo estudios acerca de la diversidad genética de hongos fitopatógeno como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y *Discula destructiva* (Aveskamp et al., 2009b).

La técnica de la PCR es altamente sensible y con el fin de asegurar el éxito de la misma es conveniente utilizar al inicio pocas moléculas de ADN molde (en el orden de los nanogramos); pero debido a esta propiedad, es muy fácil que se amplifiquen secuencias exógenas de ADN contaminante, si no se toman las precauciones necesarias durante el establecimiento de la reacción (Valadez-Moctezuma et al., 2001)

Su principio es muy sencillo y está basado en la amplificación del ADN en condiciones *in vitro*, obteniéndose al final del proceso la replicación exponencial de la secuencia blanco hasta en un millón de veces, aún como se mencionó anteriormente en presencia de gran cantidad de moléculas de ADN no relacionadas, trayendo como producto un ADN altamente homogéneo el cual es una excelente fuente para diversas manipulaciones moleculares (Ayra et al., 2001).

La técnica DAF es capaz de detectar diferencias genéticas en una gran variedad de organismos, aunque es relativamente sencillo encontrar diferencias entre organismos a nivel de especie DAF puede encontrar diferencias en relaciones mucho más estrechas incluyendo análisis de pedigrí. Esta técnica se basa en tres pasos: i. amplificación del ADN ii. Separación del ADN mediante electroforesis iii. Tinción para la resolución de los fragmentos obtenidos (tinción de plata) (Caetano-Anollés & Bassam, 1993)

Con el fin de discriminar la variedad del complejo *P. exigua* (*B. exigua* nov.) se han llevado a cabo investigaciones utilizando los Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP, por

sus siglas en inglés). Esta técnica es una combinación de las metodologías basadas en hibridación y PCR.

Los AFLP consisten en la digestión completa del ADN genómico total con enzimas de restricción, seguida de la amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos para detectar polimorfismos debidos a mutaciones en la secuencia de ADN en, o cerca de, los sitios de restricción. Los polimorfismos se detectan por electroforesis como un patrón de fragmentos de ADN amplificados (bandas) que difieren en número y tamaño, este patrón es altamente específico y debido a las restricciones de la técnica es altamente reproducible (Serrato & Ramos, 2014)

Al igual que otras técnicas de marcadores moleculares, el proceso inicia con el aislamiento del ADN genómico y su restricción completa con dos endonucleasas diferentes Eco RI y Mse I. Eco RI reconoce una secuencia de seis pares de bases (pb) al interior del genoma y Mse I reconoce una secuencia de 4 pb. A través de la acción combinada de ambas endonucleasas, se obtienen un gran número de fragmentos con frecuencias (en número descendente): Mse I-Mse I >>>Mse I- Eco RI >>>Eco RI-Eco-RI. La técnica AFLP selecciona únicamente los fragmentos Mse I-Eco RI ya que si se amplificaran todos los fragmentos el análisis correspondiente sería muy complejo.

Posteriormente a la restricción continua la ligación de un adaptador específico de doble cadena el cual tiene una longitud de 25 a 30 pb a cada lado del fragmento de restricción, y dichos adaptadores cuentan con una cola 5'. Estas secuencias de adaptadores serán reconocidas por los iniciadores específicos para la PCR que se unen para dar inicio a la primer "amplificación pre-selectiva"; esto significa que solo una parte de los fragmentos Mse I-Eco RI se amplificarán en esta etapa del proceso (SRFA, Selective Restriction Fragment Amplification) y esta se lleva a cabo con el uso de iniciadores que contienen una base extra en el extremo 3'; resultando un subconjunto de fragmentos que además de llevar la secuencia complementaria al iniciador, tienen complementariedad con la base extra adicionada. Paso seguido, estos productos amplificados son sujetos a una selección mucho más rigurosa en donde se consideran iniciadores con dos o tres bases extras (Valadez-Moctezuma et al., 2001).

Esta técnica permite una mayor detección de polimorfismos comparada con otras metodologías basadas en el uso de la PCR haciendo posible identificar marcadores genéticos con mayor facilidad.

Uno de los grandes usos de esta técnica se basa en la aplicación en investigaciones de caracterización genética. Gracias a la gran cantidad de bandas reproducibles que se generan, se ha convertido en una

herramienta muy importante en la caracterización molecular de organismos difíciles de determinar a nivel morfológico.

Dentro de las ventajas de esta técnica se encuentran las siguientes: 1) son un marcador neutral, 2) proveen información de todo el genoma del organismo, 3) no requieren información previa del genoma, 4) producen un gran número de bandas polimórficas, 5) es altamente reproducible, 6) se usan pequeñas cantidades de ADN, 7) una vez estandarizados se generan a gran velocidad, 8) se pueden usar en análisis de poblaciones, análisis de genética cuantitativa tipo QTL (quantitative trait loci) y de filogenia y 9) nivel de resolución bueno tanto en electroforesis como en electroforesis capilar.

La técnica presenta las siguientes desventajas: 1) mayor número de pasos con otros marcadores dominantes como ISSR y RFLP, 2) no pueden analizarse en geles de agarosa, 3) es una técnica costosa, comparada con otras, 4) son un marcador dominante que no permite distinguir heterocigos de los homocigos dominantes, 5) las bandas pueden ser homoplasias (son iguales en tamaño pero su origen es diferente) (Serrato & Ramos, 2014).

Abeln et al. en el (2002), llevaron a cabo una investigación utilizando esta técnica con el objetivo de hallar diferencias genéticas en variedades pertenecientes a la especie *P. exigua* (*B. exigua* nov.) mediante el uso de 43 aislamientos del hongo altamente similares. Las regiones ITS amplificadas en este estudio fueron bastante similares proporcionando perfiles de bandas muy claros y altamente reproducibles, los cuales eran variables entre las cepas.

Este análisis reveló de manera contundente la similitud genética de las siguientes variedades: *populi*, *linicola*, *heteromorpha*, *viburni*, *forsythiae* y *noackiana* y las especies exóticas *P. destructiva* y *P. lycopersici*. Y adicionalmente una fuerte evidencia genética para la similitud entre las variedades: *exigua*, *diversispora* y *lilacis*.

Los resultados de esta investigación arrojaron como gran conclusión que la AFLP fue altamente informativa; se observaron muchos patrones de bandas diferentes. Las reacciones duplicadas confirmaron que AFLP es una técnica altamente reproducible en comparación con otras técnicas de huellas dactilares, como se ha demostrado anteriormente (Abeln et al., 2002).

8.15.11 Utilización de cebadores universales y bases de datos

El auge en el uso de técnicas moleculares en estudios filogenéticos dio paso al desarrollo y construcción de bases de datos internacionales que sirvieran como repositorio de las secuencias halladas por los científicos durante las investigaciones relacionadas con estudios en sistemática de hongos.

Un claro ejemplo de este tipo de caracterizaciones moleculares se observa en el trabajo realizado por Koike et al. en el (2006), utilizando secuencias de los genes correspondientes al ARN Ribosomal 5,8S; mediante el uso de cebadores universales (regiones conservadas de ADN). El proceso está claramente definido: 1) obtención de los aislamientos de interés (en este caso *P. exigua*), 2) Caracterización morfológica, 3) Extracción del ADN, 4) Selección de los cebadores (ITS1, ITS2), 5) Realización de la PCR con perfiles basados en los cebadores escogidos, 6) Obtención de los productos de PCR, 7) limpieza de dichos productos, 8) secuenciación de los productos de PCR (para el experimento se usaron los primers ITS1- ITS4), 9) limpieza de las secuencias obtenidas y 10) comparación de las secuencias en bases de datos. Este fue el primer reporte de *P. exigua* causando enfermedades en el cultivo de la lechuga en Estados Unidos, el cual estuvo soportado por caracterización morfológica y molecular.

8.15.12 Utilización de marcadores filogenéticos

A mediados de los 90's se empezaron a conocer varios marcadores que eran capaces de identificar al género *Phoma* sp., esto gracias a los avances en las técnicas moleculares y bioquímicas. Como se describió anteriormente el uso de cebadores universales son una herramienta útil para la caracterización molecular. Sin embargo, se ha demostrado que a lo largo de las últimas décadas que el uso de la región ITS pueda inferir diferencias en las relaciones con sus parientes más cercanos, razón por la cual se hizo necesario la búsqueda de otros loci lo suficientemente reveladores para realizar un análisis filogenético más robusto.

Dentro de los genes de interés se ha encontrado que el Factor de Elongación es bastante útil para investigar las relaciones entre hongos en varios niveles. Con base en esta información, Irinyi et al.

(2007) obtuvieron secuencias codificantes para el factor de elongación de traslación 1 subunidad alfa (EF1 α =tef1), de seis especies pertenecientes a *Phoma* sp. con el objetivo de resolver las relaciones filogenéticas entre ellas, y consideradas estrechamente emparentadas antes de realizarse este estudio. Según la investigación la selección de este gen radica en la importancia de su función, ya que es un componente esencial en el proceso de síntesis de proteínas en eucariotas y arqueobacterias, promoviendo la unión de aminoacil-tRNA al ribosoma.

Las especies estudiadas fueron inicialmente caracterizadas morfológica y fisiológicamente de acuerdo a Boerema et al. (2004), siendo identificadas como: *P. exigua* var. *linicola*, *P. eupyrena*, *P. destructor*, *P. medicaginis*, *P. foveata*, y *P. herbarum*. Todas ellas aisladas de plantas infectadas. Adicionalmente se incluyeron en el estudio las secuencias del factor de elongación de: *Ascochyta* sp., *Ascochyta pisi* y *Phoma pinodella*.

Mediante el uso de la técnica PCR se obtuvo un único producto entre 250 y 260 pb en todas las amplificaciones, usando los cebadores EF1-728F y EF1-986R para cada una de las 6 cepas de *Phoma* sp. probadas. Y con base en esta información se construyó un árbol filogenético en donde se observó que las especies de *Phoma* sp. estudiadas estaban claramente separadas los taxones *Aschochyta*.

Aquí se introduce una característica fundamental en estudios de filogenia y es la obtención de árboles filogenéticos mediante algoritmos computacionales. Una herramienta fundamental en la resolución de las relaciones genéticas entre poblaciones de estudio.

Para la generación de los árboles filogenéticos, el algoritmo genético, crea una población de árboles aleatoria cuyas hojas o nodos son diferentes. Cada elemento (árbol) se evalúa mediante una función objetivo híbrida, la cual combina dos criterios normalizados: máxima parsimonia y matriz de distancia (DMM) que darán su valor de aptitud a cada elemento, posteriormente se realizan las operaciones básicas del algoritmo genético como son la selección, cruza y mutación (Ryosuke, 2002).

Un resultado importante obtenido en este estudio y que confirma la necesidad de realizar estudios de caracterización molecular con el fin de entender mejor la biología de este género, se basó en que el árbol filogenético basado en secuencias *tef* no admite las secciones tradicionales de *Phoma* sp. basadas en caracterización morfológica.

8.15.13 Desarrollo de PCR convencional y PCR en tiempo real

En el año (2007) Cullen et al. desarrollaron ensayos de PCR convencionales y cuantitativas para la detección de patógenos afectando tubérculos de papa almacenados. El estudio fue llevado a cabo con el objetivo de detectar en una misma reacción los siguientes patógenos: *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum* y *P. exigua* var. *foveata*.

Para el desarrollo de la PCR convencional y tiempo real se diseñaron cebadores correspondientes a la región ITS del ADNr. Una vez diseñados los cebadores se obtuvieron amplicones de 150 pb aproximadamente permitiendo una amplificación eficiente, provenientes del análisis de más 120 aislamientos presentes en el estudio.

A pesar de que los cebadores fueron diseñados para identificar la variedad *foveata*, en los resultados obtenidos se encontró que también identificaban la variedad *exigua*, así como especies diferentes a *Phoma* sp. Esto demuestra la complejidad en la identificación precisa del complejo *Phoma*, debido a que en las PCR ensayadas no se distinguían las dos variedades, ya que las alineaciones obtenidas de las regiones ITS1 - ITS2 eran idénticas.

La metodología denominada PCR en tiempo real fue desarrollada por la necesidad de cuantificar diferencias en la expresión del RNA mensajero (RNAm) y la necesidad de aprovechar la disponibilidad de pequeñas cantidades de RNAm en algunos procedimientos. Esta última necesidad hace de la PCR una herramienta valiosa cuando las cantidades de RNA son bajas. La PCR en tiempo real ofrece resultados cuantitativos y una de sus más grandes ventajas es la relativa facilidad y conveniencia del uso en comparación con algunas metodologías más antiguas., además de que los productos de la amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos.

Esta técnica se basa en la detección de un reportero fluorescente y su cuantificación, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto PCR presente en la reacción. Razón por la cual se requiere de un termociclador que tenga un sistema de detección capaz de obtener y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo (Martínez & Silva, 2004).

En una PCR en tiempo real cada reacción es caracterizada en el momento en que la amplificación de un producto PCR es detectado, después de un número fijo de ciclos. Entre más alto es el número de

copias obtenidas del blanco mucho más pronto será observable el aumento en la fluorescencia. Esto revolucionó la capacidad de monitorear el progreso en tiempo real de la PCR.

8.15.14 Análisis de secuencias multi-locus

Como ya se ha mencionado anteriormente, individuos pertenecientes al complejo *Phoma* generan grandes pérdidas a nivel económico en cultivos de importancia comercial. Recordemos que desde el punto de vista morfológico se ha demostrado que la diferenciación de las variedades y especies relacionadas, son en muchos casos indistinguibles. A pesar de los grandes avances en biología molecular se hace necesario el desarrollo de técnicas más sensibles y confiables en el diagnóstico y revelación filogenética de este tipo de patógenos basándose en el ADN.

Entre las técnicas moleculares disponibles destaca la técnica de secuenciación multilocus MLST (MultiLocus Sequence Typing) que se basa en el análisis de las secuencias parciales de una serie de genes conservados; pequeñas variaciones en la secuencia de estos genes permiten diferenciar claramente las distintas cepas de la misma especie (De las Rivas et al., 2007).

La MLST es altamente confiable ya que revela el alto grado de polimorfismo que puede estar presente en las secuencias de nucleótidos y adicionalmente en cada nuevo estudio se pueden usar y agregar los datos obtenidos en investigaciones anteriores. Esta metodología entró a reemplazar antiguas técnicas como la Electroforesis Enzimática Multilocus (MLEE), la hibridación ADN-ADN y las RAPDs. Posee una ventaja observable sobre el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de que se pueden detectar y agregar a la base de datos nuevas posiciones de nucleótidos polimórficos en cualquiera de las secuencias de fragmentos de genes (Taylor & Fisher, 2003).

Utilizando la técnica MLTS, Chen et al. (2015) analizaron un total de 287 aislamientos identificado morfológicamente como *Ascochyta* sp., *Didymella* sp. y *Phoma* sp. provenientes del Westerdijk Fungal Biodiversity Institute y del Plant Protection Organization of the Netherlands con tres objetivos específicos: 1) determinar la filogenia de estos tres géneros usando secuencias multilocus (LSU, ITS, rpb2 y tub2), 2) delimitar la filogenia de Didymellaceae, revisando su taxonomía desde un enfoque polifásico y 3) designar epítipos para estabilizar la aplicación de nombres dentro de la familia.

Como resultado se obtuvieron 286 grupos taxonómicos contenidos en una alineación concatenada, arrojando un total de 2620 caracteres incluyendo los ‘gaps’ (espacios en blanco): 966 caracteres para LSU, 648 para ITS, 395 para tub2 y 599 para rpb2. De los cuales 833 eran patrones de sitios únicos: 45 para LSU, 270 para ITS, 216 para tub2 y 352 para rpb2. Se analizaron un total de 12858 árboles, arrojando 17 clados monofiléticos bien soportados.

9. Flujo de trabajo para desarrollar una metodología de diagnóstico molecular: *P. exigua* (*B. exigua* nov.)

A partir del numeral 9 en adelante, se presentará la descripción de las pautas a seguir mediante el seguimiento de un flujo de trabajo y tomando a modo de ejemplo actividades preliminares de implementación llevadas a cabo en las instalaciones del LSG, con el fin de desarrollar una herramienta de diagnóstico molecular para el hongo *P. exigua* (*B. exigua* nov.).

9.1 Identificar regiones de ADN disponibles en bases de datos que permitan la diferenciación de especies del género *Phoma* sp.

9.1.1 Obtención de secuencias de genes usados en filogenia de bases de datos públicas. (Genes: ITS, β -tubulina, ACT, LSU y TEF)

Con base en la literatura consultada, fueron seleccionados los genes ITS, β -tubulina, ACT, LSU y TEF, basándose en ellos, desarrollar la técnica de diagnóstico molecular en *P. exigua*; ya que son los más secuenciados para este hongo (ver, Tabla 3). Esto se debe a la alta capacidad que tienen de resolver filogenias y de acuerdo a Kowalski et al. (2019), son la mejor opción para la identificación de aislamientos del género *Phoma* sp.

Por lo tanto, los tamaños de los productos de PCR generados por estos genes, sirven para diferenciar taxones emparentados, en muchos casos hasta nivel de variedad y su variación dentro del genoma es constante.

En estudios de filogenia de hongos se suelen amplificar regiones del genoma altamente conservados y las regiones más utilizadas generalmente son los genes ribosomales. El ribosoma eucariota cuenta

con dos subunidades de ARN ribosomal (40S y 60S) las cuales son codificadas por tres genes: un gen llamado 5,8S, la subunidad pequeña 18S (SSU, por sus siglas en inglés) y por último la subunidad grande 28S (LSU). Estos tres genes se encuentran separados entre sí por regiones espaciadoras de transcripción interna (ITS). La región ITS y la SSU son regiones que acumulan mutaciones neutrales a través del tiempo y por este motivo son extensamente usadas en comparaciones taxonómicas de base filogenética (Garzón, 2013).

El “factor de elongación de traducción 1” es parte del complejo EF1 citosólico cuya función principal es promover la unión de Aminoacil-tRNA al ribosoma en un proceso dependiente del Guanosin Trifosfato (GTP, por sus siglas en inglés). Hace parte esencial del proceso de síntesis de proteínas en las células eucariotas y debido a que es una proteína altamente conservada se ha sugerido que tiene propiedades ideales para la interferencia filogenética (Irinzi et al., 2007).

La β -tubulina, es una proteína que hace parte constituyente de los microtúbulos en células eucariotas y esta región es ampliamente usada para la identificación de hongos ya que permite establecer diferencias entre individuos de una misma especie cuando se realizan comparaciones de las zonas intrónicas del gen (Garzón, 2013).

Estudios filogenéticos realizados en *Phoma* sp. han demostrado que las secuencias de Actina, proporcionan una resolución alta para la delimitación de especies emparentadas en varios ensayos siendo muchas veces consideradas, más eficientes que las regiones ITS (de Gruyter et al., 2012).

Es importante mencionar que para desarrollar una metodología de diagnóstico molecular existen dos opciones: 1) realizar comparación de genes, 2) realizar comparación de genomas. Para el caso particular de *P. exigua* la única opción disponible fue la número 1, ya que en las bases de datos consultadas solo se encontraron cuatro genomas secuenciados. Con un número tan reducido de genomas disponibles no es posible realizar procesos de comparación. Por esta razón se llevó a cabo la selección de los genes anteriormente mencionados.

Normalmente para este tipo de investigaciones la base de datos de secuencias más usada por excelencia y la de mayor confiabilidad, es la custodiada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de los Institutos Nacionales de Salud. El NCBI fue creada en 1988 con el fin de desarrollar sistemas de información relacionados con biología molecular.

Adicionalmente el NCBI tiene la responsabilidad de mantener la base de datos de secuencias de ácidos nucleicos GenBank®, la cual recibe datos a través de colaboraciones internacionales con el Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ) y el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA), así como de la comunidad científica (Agarwala et al., 2015).

Los recursos bioinformáticos ofrecidos por el NCBI se pueden encontrar a través de su página de inicio (NCBI, 2020).

Para desarrollar esta actividad, se debe realizar una búsqueda de secuencias y usando una base de datos confiable. Esta actividad requiere de ciertas habilidades en bioinformática y actualmente existen gran variedad de recursos vía web que explican de manera detallada como llevar a cabo esta labor de búsqueda y obtención.

Básicamente el proceso tiene los siguientes pasos: 1) ingreso a la página principal del NCBI, 2) Seleccionar la base de datos de nucleótidos llamada “Nucleotide”, 3) Digitar en el área de búsqueda el organismo de interés, 4) descargar y almacenar las secuencias halladas (generalmente se almacenan en formato .FASTA) (Fig. 24).

The screenshot displays the NCBI Nucleotide search results page. At the top, the search criteria are set to 'Nucleotide' with the query 'Phoma exigua'. A search button is visible. Below the search bar, there is a red banner with COVID-19 information. The main content area shows search results for 'Phoma exigua', with two items listed. Item 1 is 'Phoma exigua 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence' (532 bp linear DNA, Accession: AY927784.1). Item 2 is 'Phoma exigua strain 02-059 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence' (509 bp linear DNA, Accession: AY367351.1). A download dialog box is open over the results, showing options to download 1597 items in FASTA format, sorted by Accession, to a file.

Figura 24. Búsqueda de las secuencias de interés en la base de datos del NCBI.

Una vez almacenadas las secuencias, es importante realizar un proceso de depuración de las mismas y eliminar las redundancias. La redundancia de secuencias significa, que en la base datos existen dos o más secuencias idénticas, las cuales han sido rotuladas o identificadas de manera diferente, es decir, que el proceso de depuración se basa en la eliminación de secuencias “repetidas”.

Es importante mencionar que estas bases de datos públicas están alimentadas por investigadores a nivel mundial y este hecho aumenta la probabilidad de que dichas bases almacenen información redundante. Para el presente ejercicio en particular se hallaron 9645 secuencias de genes disponibles en las bases de datos públicas, y después de realizar la labor de eliminación de redundancias ese número se redujo a 1299 (ver, Tabla 4).

Para efectos prácticos se recomienda que una vez se hayan eliminado las redundancias clasificar las secuencias obtenidas por cada gen encontrado y de esta manera tener un panorama global de la disponibilidad de información relevante para iniciar la investigación.

Tabla 4. Relación de número de secuencias por cada gen hallado.

Secuencias	Boeremia sp.			Phoma sp.		Total
	Cantidad	especies/ varied.	Otros	Cantidad	especies/ varied.	
Internal Transcribed Spacer - ITS	416	23	3	117	7	533
β - tubulin	220	12	2	10	2	230
Actin	116	9		72	8	188
Large Ribosomal Subunit - LSU	99	13		54	1	153
Translation Elongation Factor - TEF	88	10		9	2	97
Calmodulin	68	22	1	1	1	69
RNA polymerase II - RPB2	29	18		0	0	29
Total Global	1036	107	6	263	21	1299

9.1.2 Alinear secuencias mediante el uso del Software bioinformático MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Una vez se han obtenido las secuencias de interés estas deben ser limpiadas y alineadas con el fin de eliminar aquella información que pudiese generar ruido al momento de los análisis correspondientes. Para este fin existen a disposición software especializados en el tema los cuales deben adquirirse la experiencia requerida en su manejo y uso correspondiente. Para esta propuesta se menciona uno de fácil acceso a estudiantes e investigadores llamado MEGA (versión 10.1) (Fig. 25).

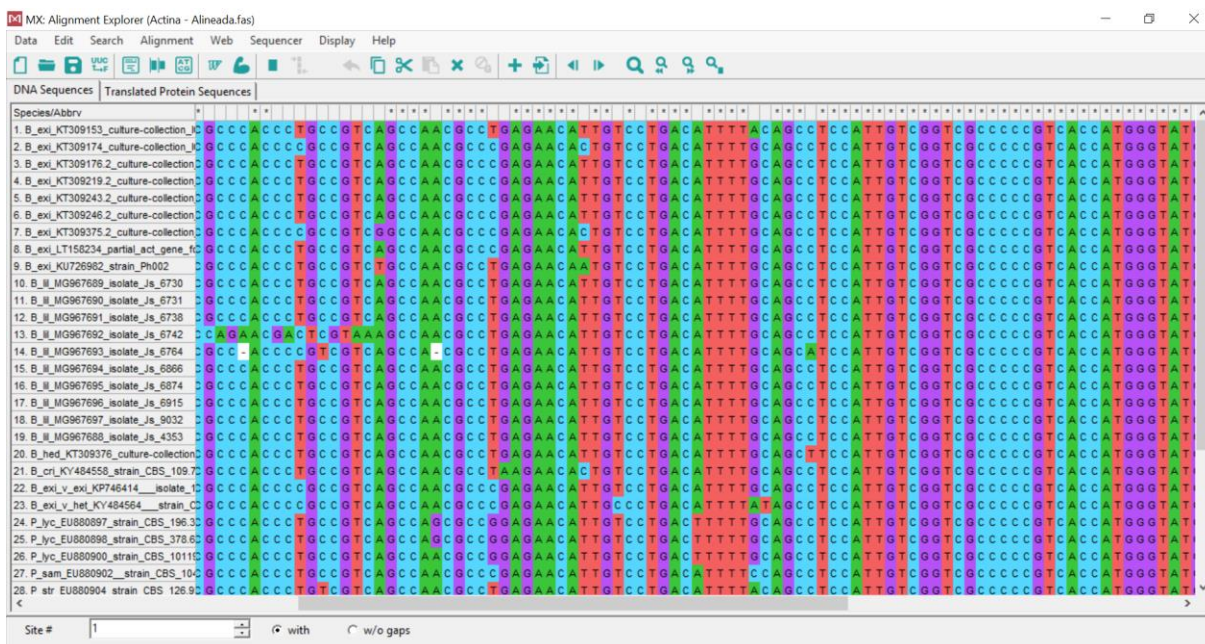


Figura 25. Ejemplo de secuencias alineadas y depuradas utilizando el Software MEGA®.

9.1.3 Construcción de árboles filogenéticos.

Cuando ya se tienen las secuencias alineadas y separadas por genes, se inicia el proceso de construcción de árboles filogenéticos. Para la construcción de dichos árboles se pueden utilizar tanto secuencias de nucleótidos como de proteínas. Por tal razón es importante escoger muy bien los genes que se quieren analizar, es decir, que su análisis aporte información contundente que revele las relaciones filogenéticas de los organismos de los cuales se obtuvieron las secuencias.

Antes de realizar la búsqueda de secuencias en las bases de datos, es imprescindible realizar antes una búsqueda en la literatura acerca de trabajos previos en filogenia y desde el punto de vista científico

analizar cuáles han arrojado mejores resultados a través del tiempo a nivel sistemático (información presentada en la sección 8).

Con base en la información presentada anteriormente, se recomienda que para adquirir experiencia en este tipo de herramientas bioinformáticas, se deben utilizar secuencias de nucleótidos, ya que ofrecen mayor información cuando se quiere estudiar organismos estrechamente relacionados (complejo *P. exigua* para este ejemplo).

Con las secuencias ordenadas y alineadas el siguiente paso es la construcción de los árboles filogenéticos los cuales de manera visual brindarán información importante acerca de cuán emparentados están dos organismos dentro del análisis correspondiente.

En la figura 26 se puede observar claramente la conformación de un árbol filogenético utilizando a alineamientos correspondientes al gen de la Beta-tubulina para este ejemplo.

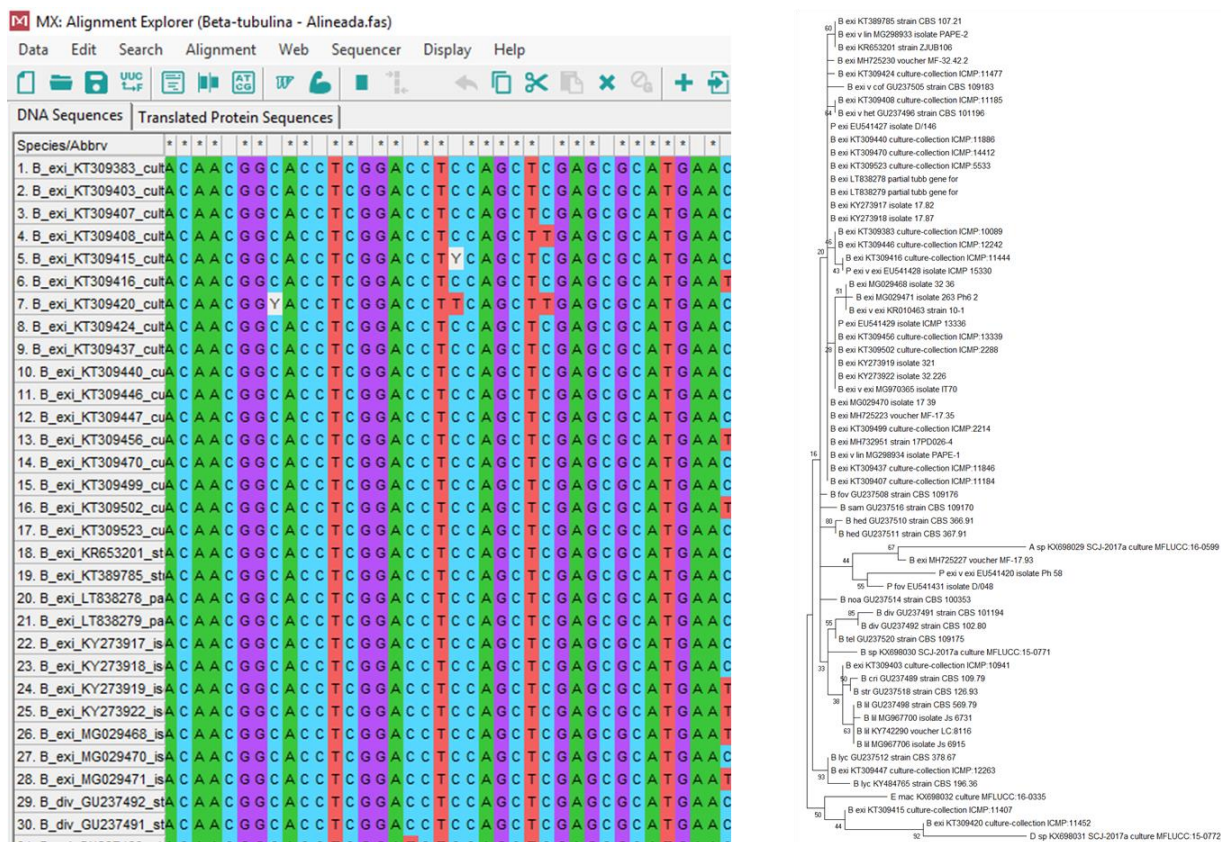


Figura 26. Árbol filogenético correspondiente al complejo *P. exigua* a partir de alineamientos de secuencias del gen Beta-tubulina.

9.2 Validar *in silico* y en laboratorio cebadores específicos para *P. exigua* en una población de prueba.

9.2.1 Diseñar cebadores específicos para la identificación molecular hasta nivel de especie de *P. exigua*.

Para el diseño de cebadores es necesario tener en cuenta que una PCR convencional debe poseer unas condiciones mínimas requeridas para su buen rendimiento y estas se definen como:

- Duración de las fases de acoplamiento y elongación
- Calidad de los cebadores utilizados con sus respectivas temperaturas de fusión.
- Tipo de enzima utilizada (Taq polimerasa)
- Estandarizar los volúmenes de reactivos y de ADN molde
- Definición del amplicón o producto PCR que se va a obtener.

Para un correcto diseño de cebadores es imprescindible que cumplan con tres criterios:

- Garantizar que las temperaturas de alineamiento sean similares, esto con el fin de aumentar el rendimiento. Normalmente esto ocurre cuando hay un porcentaje promedio de entre 50% y el 60% de Guanina y Citosina.
- Los cebadores no deben favorecer la formación de horquillas (hairpins)
- Sebe garantizar que no sean complementarios.

Se recomienda que durante el diseño de cebadores para PCR convencionales, se debe evitar que las secuencias terminen en GGT, TTA, GGG, ATT, CGA, TAA o (Onodera & Melcher, 2004).

Actualmente existen herramientas vía web para el diseño de cebadores y entre ellos se pueden mencionar: VirOligo, MFEprimer3, primer3, Vector NTI, InSilicoPCR, entre otros.

9.2.2 Extraer y cuantificar ADN de población prueba con hongos pertenecientes al género *Phoma* sp.

Para este paso dentro de las instalaciones del LSG se construyó una población prueba de individuos pertenecientes al género *Phoma* sp., de no menos de 15 cepas morfológicamente similares, aisladas de semillas de frijol y forrajes tropicales los cuales cumplían con todos los criterios de caracterización morfológica, y de esta manera se garantizó que el ensayo estuviese dentro del criterio de evaluación que se deseaba abarcar, el cual era, identificar hasta nivel de especie, aquellas cepas que desde el punto de vista morfológico pertenecieran al complejo *Phoma*.

Adicional a la caracterización morfológica hasta nivel de especie, es importante mencionar que, con el fin de asegurar la calidad del ensayo, esta población debió ser identificada molecularmente hasta nivel de especie mediante el uso de secuenciación de primera generación a través del uso de cebadores universales.

Una vez las cepas fueron caracterizadas morfológicamente y molecularmente el paso siguiente se enfocó en la estandarización de la extracción de ADN. Actualmente existe una gran variedad de protocolos de obtención de ADN fúngico, los cuales deben ser ajustados a las condiciones de la muestra y facilidad en la obtención de la misma. Generalmente para hongos el ADN se extrae directamente del tejido micelial, y en ese caso se debe asegurar el crecimiento de las cepas en ambientes sin presencia de agentes contaminantes, es decir, utilizar aislamientos puros de cada individuo.

Para tal fin existen dos opciones de crecimiento: 1) siembra de la cepa en medio de cultivo líquido (caldos enriquecidos, medios universales sin presencia de agentes coagulantes, etc.), 2) en medios de cultivos sólidos. Dependiendo del substrato seleccionado así mismo se llevarán a cabo las actividades de recuperación del micelio y posterior extracción.

Una vez se haya obtenido el ADN fúngico, es necesario determinar la calidad del mismo con el fin de estimar su concentración y determinar la presencia de impurezas en la muestra obtenida. Para tal fin se debe emplear un equipo de espectrofotometría siguiendo los procesos indicados por el fabricante.

9.2.3 Evaluar la calidad de los cebadores diseñados mediante el análisis in silico en cuanto a especificidad y eficiencia de la reacción de PCR para la síntesis de tres parejas de cebadores promisorios.

Como se ha mencionado en secciones anteriores, la técnica PCR ofrece amplias ventajas frente a otras metodologías, gracias a su alto nivel de sensibilidad y resolución de filogenias. Sin embargo, esta técnica depende en gran parte de la calidad de los genes seleccionados o diseñados para el ensayo, de ahí la importancia de validar su diseño en condiciones artificiales con el propósito de asegurar su rendimiento en condiciones reales.

Debido a que la PCR es una técnica relativamente costosa, es importante tomar las medidas necesarias que estén al alcance del investigador y de esta manera reducir los costos evaluando cebadores recién diseñados. Por tal razón la validación *in silico* es una alternativa eficiente en la cual a través de algoritmos computacionales se analizan, verifican y validan si los pares de cebadores diseñados son aceptados o rechazados. Con esto se elimina la posibilidad de desperdiciar algún tipo de reactivo de alto costo (Orozco-Ugarriza et al., 2016).

9.2.4 Diseño y corrido de la reacción de PCR

Con el fin de validar la eficiencia de los cebadores y su capacidad discriminativa se recomienda llevar a cabo una prueba de calidad, probando los cebadores en individuos altamente emparentados y confirmar la especificidad de los mismos, usando ADN de tres especies de *Phoma* sp., dos especies de Ascomycetes pertenecientes a la misma familia y una especie perteneciente a la misma clase.

9.2.5 Secuenciar por método Sanger los productos de la PCR obtenidos.

Una vez se hayan obtenido los productos de PCR de la población prueba, estos deben ser secuenciados utilizando el método Sanger. El proceso de secuenciación de productos de PCR se hace de manera comercial, es decir, se envían las muestras a laboratorios especializados en el tema. Dichas muestras

deben ser rotuladas y enviadas de acuerdo a protocolos especiales y cada laboratorio cuenta con sus propias condiciones de recibo y procesamiento de las mismas.

Adicionalmente, entidades educativas como universidades públicas y privadas prestan este tipo de servicios de secuenciación y los valores oscilan dependiendo si las muestras serán secuenciadas en el país de origen o deberán ser enviadas a laboratorios de secuenciación internacionales.

9.2.6 Comparar las secuencias obtenidas en bases de datos para la identificación molecular de *P. exigua*.

Dentro de los recursos que ofrece el NCBI, se encuentra la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST, por sus siglas en inglés). Es una de las más utilizadas cuando se quiere comparar información de secuencias de nucleótidos, así como recuperar dichas secuencias de bases de datos. Por lo tanto, esta herramienta representa un excelente punto de partida para aquellos investigadores que no han tenido experiencias previas con el manejo y uso de bases de datos públicas.

Desde su creación la herramienta BLAST ha hecho grandes contribuciones al mundo científico, abarcando varios campos de la biología como lo son: biología molecular, bioquímica de proteínas, genética molecular, entre otros.

La herramienta BLAST es la estrategia más utilizada y confiable es la búsqueda de similitud de secuencias. Se usa para la caracterización de secuencias recién determinadas (la secuencia de consulta) con respecto al porcentaje de similitud de cualquier secuencia similar que se encuentre almacenada en la base de datos (Syngai et al., 2013).

9.2.7 Alinear secuencias mediante el uso del Software bioinformático MEGA.

Al igual que en la sección 9.1.2 se realiza este proceso con el fin de eliminar aquella información que pueda causar interferencias en los análisis.

9.2.8 Selección de cebadores para estandarizar la metodología de diagnóstico molecular.

Se seleccionará el cebador que haya obtenido los mejores rendimientos, en cuanto a las características basadas en la energía libre de Gibbs y productos de amplificación (libre de dímeros).

Los cebadores u oligonucleótidos iniciadores de la reacción, son fragmentos complementarios que se unirán a cada una de las dos cadenas del ADN templado que se han separado. Por tal razón es muy importante invertir el tiempo necesario en analizarlos a profundidad para tomar buena decisión basada en unos criterios generales previamente establecidos. En la Tabla 5 se relacionan los criterios que se deben tener en cuenta para realizar una selección adecuada de cebadores.

Tabla 5. Criterios generales para la selección de cebadores.

Tamaño	Entre 25-30 nucleótidos de longitud.
Base en el extremo 3'	Debe ser una G o una C
Temperatura de fusión (<i>melting temperature</i>)	50-65°C
Contenido de GC	50-60%
Auto-complementariedad	Debe evitarse y de esta manera reducir al mínimo la formación de estructuras secundarias y los dímeros del cebador
Similaridad	Apareamiento con el ADN del 100%

Fuente: (Martínez & Silva, 2004).

Un aspecto importante a tener en cuenta para la selección de cebadores es su especificidad la cual depende directamente de su longitud (cantidad de nucleótidos que lo conforman). Los cebadores deben amplificar una secuencia única dentro del ADN molde seleccionado ya que si se diseña un cebador con una secuencia altamente repetitiva se dará lugar a productos no deseados.

Se debe tener presente el “*GC Clamp*” (pinza de GC), que es la presencia de una base de guanina (G) o citosina (C) en las últimas 5 bases (el extremo 3') en un cebador para PCR. Tener la presencia de un *GC Clamp* en un cebador de PCR puede ayudar a mejorar la especificidad de la unión del cebador a la secuencia complementaria. Sin embargo, demasiadas bases G o C, especialmente al final de los cebadores, pueden tener efectos negativos.

La temperatura de fusión (T_m) se define como la temperatura a la cual la mitad de las hebras del ADN molde están desnaturalizadas y la otra mitad formando dúplex y está influenciada por la cantidad de G+C presente en la reacción (Martínez & Silva, 2004).

9.3 Estandarizar la metodología de identificación de *P. exigua* aislado de semillas de fríjol y forrajes tropicales.

9.3.1 Realización de una prueba piloto con hongos aislados de semillas de fríjol y forrajes tropicales para realizar ajustes en la extracción de ADN y en la reacción de PCR.

En este paso del flujo de trabajo, la prueba piloto se deberá enfocar en el análisis detallado de los parámetros y criterios anteriormente mencionados, con el fin de ajustar la metodología lo mejor posible. A continuación, se mencionan algunos aspectos a tener en cuenta cuando se lleven a cabo este tipo de procesos: 1) probar diferentes temperaturas de fusión con base en los cálculos realizados, 2) Cuantificar y verificar la calidad del ADN obtenido después de la extracción, 3) Confirmar mediante secuenciación la longitud de los productos de PCR obtenidos, 4) comparar resultados obtenidos entre aislamientos de *P. exigua* (*B. exigua nov.*). (evaluación de la especificidad), así como de otras especies pertenecientes al género, 5) Probar los cebadores en géneros diferentes a *Phoma* sp., 6) Probar diferentes diluciones de ADN molde (estimación de sensibilidad), 7) Evaluar ensayos de repetitividad (corrida de la PCR por un mismo usuario en diferentes tiempos), 8) Realizar ensayos de reproducibilidad (usuarios diferentes realizan la prueba).

Con base en los resultados de sensibilidad, especificidad, repetitividad y reproducibilidad se tomará la decisión de cuáles cebadores serán seleccionados y de qué manera quedará finalmente diseñada la prueba.

En todos los casos los resultados deberán en teoría ser similares y de esta manera se validará que la metodología está correctamente estandarizada.

9.3.2 Selección y prueba de la metodología de amplificación de la PCR.

Si se cuenta con más de un gen con buenos rendimientos y alta definición de filogenia, se puede estandarizar adicional a la PCR convencional una prueba Multiplex (analizar varios genes en una misma reacción usando, PCR en tiempo real).

9.3.3 Generación del protocolo para la aplicación de la metodología que permita la identificación del hongo cuarentenario *P. exigua* (*B. exigua* nov.).

Una vez haya finalizado el proceso de desarrollo de la técnica y se cuente con la información detallada acerca de la estandarización de la técnica propuesta, el laboratorio de Sanidad de Germoplasma, con base en los parámetros de documentación y de acuerdo al sistema de gestión de calidad implementado, se generará un documento en el cual se describa el protocolo que será implementado para la diagnóstico molecular del hongo cuarentenario *Phoma exigua* presente en semillas de frijol y forrajes tropicales.

10. Conclusiones

El presente documento proporciona un conjunto de datos lo suficientemente robustos acerca de la taxonomía del hongo cuarentenario *Phoma exigua* (*B. exigua* nov.) con el objetivo de resolver las ambigüedades presentes en la actualidad en cuanto a sistemática y procesos de diagnóstico fitosanitario. Los datos y la información obtenida mediante la revisión bibliográfica realizada, proporciona las herramientas necesarias para la toma de decisiones de gran impacto en laboratorios de sanidad vegetal que tengan como objetivo la implementación de herramientas de diagnóstico molecular. Este tipo de trabajos pueden ser utilizados como punto de partida para el desarrollo de investigaciones encaminadas en ampliar y esclarecer aspectos relevantes acerca del impacto costo/beneficio mediante el uso de metodologías de diagnóstico fitosanitario de mayor sensibilidad y eficiencia.

11. Bibliografía

- Abeln, E. C. A., Stax, A. M., De Gruyter, J., & Van Der Aa, H. A. (2002). Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. *Mycological Research*, *106*(4), 419–427. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005804>
- Agarwala, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D. A., Bollin, C., Bolton, E., Bourexis, D., Brister, J. R., Bryant, S. H., Canese, K., Charowhas, C., Clark, K., Dicuccio, M., Dondoshansky, I., Federhen, S., Feolo, M., Funk, K., Geer, L. Y., Gorelenkov, V., ... Zbicz, K. (2015). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D7–D19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>
- Aguelon, M., & Dunez, J. (1984). Immunoenzymatic techniques for the detection of *Phoma exigua* in infected potato tissues. *Annals of Applied Biology*, *105*(3), 463–469. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1984.tb03072.x>
- Arenal, F., Platas, G., Monte, E., & Peláez, F. (2000). ITS sequencing support for *Epicoccum nigrum* and *Phoma epicoccina* being the same biological species. *Mycological Research*, *104*(3), 301–303. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001537>
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2008). Biología, La Vida en la Tierra. In *Biología. La vida en la tierra*. (Octava Edi). Pearson Education.
- Aveskamp, M. M., De Gruyter, J., & Crous, P. W. (2008). Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity*, *31*, 1–18.
- Aveskamp, M. M., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., & Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, *65*, 1–60. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- Aveskamp, M., Woudenberg, J. H. C., De Gruyter, J., Turco, E., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2009). Development of taxon-specific sequence characterized amplified region (SCAR) markers based on actin sequences and DNA amplification fingerprinting (DAF): A case study in the *Phoma exigua* species complex. *Molecular Plant Pathology*, *10*(3), 403–414.

- Aveskamp, Maikel M., Verkley, G. J. M., De Gruyter, J., Murace, M. A., Perelló, A., Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2009). DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia*, *101*(3), 363–382. <https://doi.org/10.3852/08-199>
- Ayra, L., Cabrera, I., Gómez, M., & Hernández, D. (2001). Empleo de marcadores bioquímicos y de DNA en la caracterización molecular de hongos entomopatógenos. *Dpto. de Ácaros y Hongos Entomopatógenos, Instituto de Investigaciones En Fruticultura Tropical (IIFT). Habana*.
- Boerema, G. H., & Bollen, G. J. (1975). Conidiogenesis and Conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. *Persoonia*, *8*(2), 111–144.
- Boerema, G. H., Gruyter, J. De, Noordeloos, M. E., & Hamers, M. E. C. (2004). *Phoma Identification Manual Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture*. CABI Publishing.
- Boerema, G. H., & Höweler, L. H. (1967). *Phoma exigua* Desm. and its varieties. *Persoonia*, *5*(I), 15–28.
- Boerema, G. H., & van Kesteren, H. A. (1964). The nomenclature of two fungi parasitizing Brassica. *Persoonia*, *3*, 17–28.
- Caetano-Anollés, G., & Bassam, B. J. (1993). DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *42*(2–3), 189–200. <https://doi.org/10.1007/BF02788052>
- Charya, M. A. S., & Reddy, S. M. (1983). Production of Lyases by *Phoma exigua* associated with seed-rot of *Vigna radiata*. *Folia Microbiologica*, *28*(2), 100–105. <https://doi.org/10.1007/BF02877364>
- Chen, Q., Jiang, J. R., Zhang, G. Z., Cai, L., & Crous, P. W. (2015). Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology*, *82*, 137–217.
- CIAT Website. (2019). Agrobiodiversidad: Recursos Genéticos. Conservación y uso de cultivos. Recuperado de: <https://ciat.cgiar.org/lo-que-hacemos/conservacion-y-uso-de-cultivos/?lang=es>
- Colmán, A., Lima, I. M., Costa, H., & Barreto, R. W. (2020). *Boeremia exigua* causing leaf spots on sweet potato in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, *15*(1), 20–21.

<https://doi.org/10.1007/s13314-020-00390-z>

Cuervo, M., Ramirez, J. C., Balcazar, M. del S., Muñoz, L., Gonzalez, D., Martínez, J., & Daniel, D. (2016). Manuel de Procedimientos del Laboratorio de Sanidad de Germoplasma - Certificación Sanitaria del Germoplasma de Fríjol, Pastos tropicales y Leguminosas forrajeras. In *Manual De Procedimientos Del Laboratorio Sanidad De Germoplasma* (Segunda Edición). [https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/81314/Manual de Procedimientos-Certificacion Sanitaria Frijol-Forrajes2.pdf?sequence=1](https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/81314/Manual_de_Procedimientos-Certificacion_Sanitaria_Frijol-Forrajes2.pdf?sequence=1)

Cuervo Ibañez, M.; Ramírez, J.C.; Martínez, M.A.; Niño, D.; Gutiérrez, A.; Muñoz, L.; Dorado, E.F.; Tamayo, M.; Quintero, P.A.; Montes, M.A. 2019. Laboratorio Sanidad de Germoplasma (LSG) del CIAT: Implicaciones y responsabilidades al ser registrado y reconocido por el ICA como laboratorio de diagnóstico fitosanitario a nivel nacional. XXXIV Congreso Colombiano de Fitopatología, AGROSAVIA C.I Tibaitatá, 17-20 septiembre, 2019. Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

Cullen, D. W., Toth, I. K., Boonham, N., Walsh, K., Barker, I., & Lees, A. K. (2007). Development and validation of conventional and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of storage rot potato pathogens, *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum* and *Phoma foveata*. *Journal of Phytopathology*, 155(5), 309–315. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01233.x>

de Gruyter, J., van Gent-Pelzer, M. P. E., Woudenberg, J. H. C., van Rijswijk, P. C. J., Meekes, E. T. M., Crous, P. W., & Bonants, P. J. M. (2012). The development of a validated real-time (TaqMan) PCR for detection of *Stagonosporopsis andigena* and *S. crystalliniformis* in infected leaves of potato and tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 134(2), 301–313. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9990-8>

De las Rivas, B., Marcobal, Án., & Muñoz, R. (2007). MLST (Multilocus sequence typing): un método molecular para la caracterización inequívoca de cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*. *Avances En Ciencias y Técnicas Enológicas: Transferencia de Tecnología de La Red GIENOL Al Sector Vitivinícola*, 34–35.

FAO. (2009). *Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura*.

- Faris-Mokaiesh, S., Boccara, M., Denis, J. B., Derrien, A., & Spire, D. (1996). Differentiation of the “Ascochyta complex” fungi of pea by biochemical and molecular markers. *Current Genetics*, 29(2), 182–190. <https://doi.org/10.1007/BF02221583>
- Garzón, N. (2013). *Caracterización e Identificación Molecular de Hongos de Suelo Aislados de Los Páramos Páramos de Guasca y Cruz Verde, Cundinamarca – Colombia*. [PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA]. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Genebank Platform. (2021). Distribution of samples within and outside the CGIAR. Number of samples distributed to users within and outside the CGIAR. Summary. 2012-2019. Recuperado de: <https://www.genebanks.org/the-platform/>
- Grondona, I., Monte, E., Garcia-Acha, I., & Sutton, B. C. (1997). *Pyrenochaeta dolichi*: An example of a confusing species. *Mycological Research*, 101(11), 1405–1408. <https://doi.org/10.1017/S0953756297004206>
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Irinyi, L., Kövics, G. J., & Sándor, E. (2007). Classification of *Phoma* species using new phylogenetic marker. *Analele Universității Din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului*, XII, 63–69.
- Jara, C., & Cotes, C. A. (2016). *Guía de enfermedades y plagas del fríjol en Colombia* (p. 12).
- Johnson, C. N. (2014). Polyphasic Taxonomy - A Tool to identify and characterize members of complex microbial communities. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.06.007>
- Koike, S. T., Subbarao, K. V., Verkley, G. J. M., Fogle, D., & O’Neill, T. M. (2006). *Phoma* basal rot of romaine lettuce in California caused by *Phoma exigua*: Occurrence, characterization, and control. *Plant Disease*, 90(10), 1268–1275. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1268>
- Kowalski, T., Kraj, W., Bednarz, B., & Rossa, R. (2019). The association of *Boeremia lilacis* with necrotic lesions on shoots and leaf petioles and its pathogenicity towards *Fraxinus excelsior*.

- European Journal of Plant Pathology*, 154(4), 961–974. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01715-0>
- Macdonald, J. E., White, G. P., & Côté, M. J. (2000). Differentiation of *Phoma foveata* from *P. Exigua* using a RAPD generated PCR-RFLP marker. *European Journal of Plant Pathology*, 106(1), 67–75. <https://doi.org/10.1023/A:1008795805409>
- Martínez, C., & Silva, E. (2004). Metodos físico-químicos en biotecnología. In *Analytical chemistry* (Vol. 62, Issue 13). <https://doi.org/10.1021/ac00212a004>
- Martínez de la Parte, E. (2006). Marcadores moleculares aplicados a estudios de diversidad genética de hongos entomopatógenos. *Revista Citrifrut*, 23(2), 31–38.
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 6115–6116. <https://doi.org/10.1093/nar/20.22.6115>
- Mosch, W. H. M., & Mooi, J. C. (1975). A chemical method to identify tuber rot in potato caused by *Phoma exigua* var. *foveata*. In *Netherlands Journal of Plant Pathology* (Vol. 81, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1007/BF02650338>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2020). NCBI Home. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Onodera, K., & Melcher, U. (2004). Selection for 3' end triplets for polymerase chain reaction primers. *Molecular and Cellular Probes*, 18(6), 369–372. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.05.007>
- Orozco-Ugarriza, M. E., Franco-Anaya, P. A., Olivo-Martínez, Y., & Original, A. (2016). VALIDACIÓN In silico DE OLIGONUCLEÓTIDOS-PRIMERS PARA LA DETECCIÓN ESPECIFICA DE *Salmonella* spp. MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. *Revista de Investigación Agropecuaria y Desarrollo Sostenible Artículo*, 42–50.
- Pineda, S. (25 de octubre de 2017). CIAT Blog. Visión de calidad, motor del laboratorio de germoplasma del CIAT. Recuperado de: <https://blog.ciat.cgiar.org/es/vision-de-calidad-motor-del-laboratorio-de-germoplasma-del->

ciat/#:~:text=El%20Laboratorio%20de%20Sanidad%20de,a%20diferentes%20%C3%A1reas%20del%20CIAT.

- Pineda, S. (05 de junio del 2019). CIAT Blog. El Laboratorio de Sanidad de Germoplasma del CIAT recibió Registro Calificado. Recuperado de: <https://blog.ciat.cgiar.org/es/el-laboratorio-de-sanidad-de-germoplasma-del-ciat-recibio-registro-calificado/>
- Rai, M., Deshmukh, P., Gade, A., Ingle, A., Kövics, G. J., & Irinyi, L. (2009). *Phoma saccardo*: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications *Phoma saccardo*: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(3), 182–196. <https://doi.org/10.1080/10408410902975992>
- Rao, K. N., Hanson, J., Dullo, E., Ghosh, K., Nowell, D., & Larinde, M. (2006). Manual of Seed Handling in Genebanks. In Bioversity International (Ed.), *Handbooks for Genebanks No. 8*.
- Reddy, P. V., Patel, R., & White, J. F. (1998). Phylogenetic and developmental evidence supporting reclassification of cruciferous pathogens *Phoma lingam* and *Phoma wasabiae* in *Plenodomus*. *Canadian Journal of Botany*, 76(11), 1916–1922. <https://doi.org/10.1139/b98-154>
- Rentaría, M. (2000). Breve revisión de los marcadores moleculares. In L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (Vol. 113, pp. 541–566). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Ryosuke, L. A. (2002). *Generación de Árboles Filogenéticos por medio de Algoritmos Genéticos de Función Objetivo Híbrido*. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.
- Serrato, A., & Ramos, S. (2014). AFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 8701, 127–148.
- Smale, M., & Jamora, N. (2020). Valuing genebanks. *Food Security*, 12(5), 905–918. <https://doi.org/10.1007/s12571-020-01034-x>
- Syngai, G. G., Barman, P., Bharali, R., & Dey, S. (2013). BLAST: An introductory tool for students to Bioinformatics Applications. *Keanean Journal of Science*, 2:(December), 67–76. https://www.researchgate.net/profile/Gareth_Syngai2/contributions

- Taylor, J. W., & Fisher, M. C. (2003). Fungal multilocus sequence typing - It's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 351–356. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00088-2)
- Tichelaar, G. M. (1974). The use of thiophanate-methyl for distinguishing between the two *Phoma* varieties causing gangrene of potatoes. In *Netherlands Journal of Plant Pathology* (Vol. 80, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/BF01981371>
- Tiwari, V. V., Gade, A. K., & Rai, M. (2013). A study of phylogenetic variations among Indian *Phoma* tropica species by RAPD-PCR and ITS-RDNA sequencing. *Indian Journal of Biotechnology*, 12(2), 187–194.
- Tran, H. S., You, M. P., Khan, T. N., & Barbetti, M. J. (2016). Infection process of *Phoma koolunga* on stem and leaf tissue of resistant and susceptible field pea (*Pisum sativum*). *Plant Pathology*, 66(2), 11.
- Turkensteen, L. J. (1987). Dark lines formed between colonies of isolates of *Phoma exigua* var. *foveata* on a semi-selective medium. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 93(2), 87–90. <https://doi.org/10.1007/BF01998094>
- Urinzwenimana, C., Melis, R., & Sibiyi, J. (2017). Genotypic Response of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to natural field infection of ascochyta blight (*Phoma exigua* var. *Diversispora* (*bubak boerema*) under diverse environmental conditions in Rwanda. *Agronomy*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/agronomy7040072>
- Valadez-Moctezuma, E., Kahl, G., Ramser, J., Hüttel, B., & Rubluo-Islas, A. (2001). Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. In *Revista Fitotecnia Mexicana* (Vol. 24, Issue 1, pp. 103–120).
- Valenzuela, N. M. A. (2018). *Taxonomía de hongos celomicetos de interés clínico*. Universitat Rovira i Virgili.
- Van der Aa, H. A., Boerema, G. H., & De Gruyter, J. (2000). Contributions towards a monograph of *Phoma* (coelomycetes) VI - 1: Section Phyllostictoides: Characteristics and nomenclature of its type species *Phoma exigua*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 17(3), 435–456.

- Varón, A. (Abril 16 del 2020). CIAT Blog. El cuidado de las semillas del futuro en tiempos de cuarentena. Recuperado de: <https://blog.ciat.cgiar.org/es/el-cuidado-de-las-semillas-del-futuro-en-tiempos-de-cuarentena/>
- Webster, J & Weber, R. 2007. *Introducing to Fungi*. New York, United States of America. Ed. Cambridge University Press. 840 p.
- Weijman, A. C. M., van Eijk, G. W., Roeijmans, H. J., Windig, W., Haverkamp, J., & Turkensteen, L. J. (1984). Mass spectrometric techniques as aids in the diagnosis of gangrene in potatoes caused by *Phoma exigua* var. *foveata*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, *90*(3), 107–115. <https://doi.org/10.1007/BF01994516>
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Wanasinghe, D. N., Papizadeh, M., Goonasekara, I. D., Camporesi, E., Bhat, D. J., McKenzie, E. H. C., Phillips, A. J. L., Diederich, P., Tanaka, K., Li, W. J., Tangthirasunun, N., Phookamsak, R., Dai, D. Q., Dissanayake, A. J., Weerakoon, G., Maharachchikumbura, S. S. N., Hashimoto, A., ... Wang, Y. (2016). Taxonomy and phylogeny of dematiaceous coelomycetes. *Fungal Diversity*, *77*(1), 1–316.
- Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding. *Genome*, *59*, 913–932.