

INFORME TECNICO FINAL

Innovaciones tecnológicas en el manejo integrado del Cuero de Sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz): Estrategias para reducir el impacto de la enfermedad por efectos del cambio climático en Colombia, Costa Rica y Paraguay

FTG-100382010

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

2015

“Este proyecto ha sido financiado por FONTAGRO”





Centro Internacional de Agricultura Tropical
International Center for Tropical Agriculture
Consultative Group on International Agricultural Research

Elizabeth Alvarez
Fitopatóloga
e.alvarez@cgiar.org
Tel. 572-4450000 Ext. 3385
Km. 17 Via Cali- Palmira, Colombia



Instituto Nacional de Innovación y
Transferencia en Tecnología Agropecuaria

Yannery Gómez Bonilla
Entomología AgroBiotecnología
Laboratorio Fitoprotección
ygoomez@inta.go.cr
Tel. of: 506-2231 5055
Fax: 506-2231 50 04



Marta Zacher de Martinez
Laboratorio de Biotecnología
martazacher@gmail.com
Centro de Investigación Hernando Bertoni (CIHB)
Tel. 595-992287744
Ruta Mcal. Estigarribia Km. 48.5, Caacupé - Paraguay



Rodrigo Campo
Profesor Titular
rodrigocampo43@hotmail.com
Universidad de Córdoba
Carrera 6 No. 76-103 Montería, Córdoba, Colombia
Tel: 574-7860300

Índice General

Resumen Ejecutivo	1
Fin	3
Objetivos específicos	3
Metodología y actividades realizadas	4
Componente 1. Analizar el impacto potencial actual y futuro del cambio climático sobre la enfermedad del CS y los vectores que la transmiten, y a la vez, plantear un estudio epidemiológico de la enfermedad en Colombia, Costa Rica y Paraguay	6
Componente 2: Implementar un sistema de producción de semilla vegetativa certificada, mediante el uso de un sistema <i>in vitro</i> y de cámaras térmicas.	11
Componente 3. Evaluar el efecto de micro-nutrientes y extractos vegetales como fertilizantes sobre el comportamiento de la enfermedad en variedades locales susceptibles.	16
Componente 4: Seleccionar genotipos de yuca resistentes o tolerantes al CS para las zonas de estudio.....	22
Discusión de resultados	31
Conclusiones.....	33
Recomendaciones	34
Difusión y publicaciones.....	35
Bibliografía	37
Anexos	40

Índice Cuadros

Cuadro 1. Reacción por PCR anidado y qPCR de las muestras de raíces de yuca con CS colectadas en Colombia, Costa Rica y Paraguay.	9
Cuadro 2. Tratamientos con inductores de resistencia evaluados en el cultivo de yuca.....	16
Cuadro 3. Análisis de varianza correspondiente a la cantidad de raíz comercial. Choré - Paraguay. 2015	17
Cuadro 4. Análisis de varianza correspondiente a la cantidad de raíz no comercial. Choré - Paraguay 2015	18
Cuadro 5. Análisis de varianza correspondiente al peso de raíz comercial. Choré - Paraguay. 2015	19
Cuadro 6. Análisis de varianza correspondiente al peso de raíz no comercial. Choré - Paraguay. 2015	19
Cuadro 7. Análisis de varianza correspondiente al peso de raíz en agua. Choré - Paraguay. 2015.....	20
Cuadro 8. Promedios para las variables productivas de plantas de yuca tratadas con Inductores de resistencia durante su ciclo productivo en el ensayo realizado durante el 2014.	21
Cuadro 9. Promedios para las variables productivas y variables de la enfermedad obtenidos en los genotipos de yuca del Ensayo 1.....	22
Cuadro 10. Promedios para las variables productivas y variables de la enfermedad obtenidos en las diferentes variedades de yuca del Ensayo 2.	23
Cuadro 11. Cosecha, variables de rendimiento, severidad e incidencia de la enfermedad de CS en plantas de yuca. INTA Mayo 2013.	25

Índice Gráficos

Gráfico 1. Promedios de la incidencia de la enfermedad. Choré – Paraguay. 2015	17
Gráfico 2. Promedios del número de raíz comercial. Choré – Paraguay. 2015	18
Gráfico 3. Promedios del número de raíz no comercial. Choré – Paraguay. 2015	18
Gráfico 4. Promedios del peso de raíz comercial. Choré – Paraguay. 2015.....	19
Gráfico 5. Promedios del peso de raíz no comercial. Choré – Paraguay. 2015.....	20
Gráfico 6. Promedios de peso de raíz en agua. Choré – Paraguay. 2015.....	20
Gráfico 7. Promedio del número de raíces comerciales. Choré – Paraguay. 2015.....	28
Gráfico 8. Promedios del número de raíces no comerciales. Choré – Paraguay. 2015.....	29
Gráfico 9. Promedios del peso de raíces comerciales. Choré – Paraguay. 2015.	29
Gráfico 10. Promedios del peso de raíces no comerciales. Choré – Paraguay. 2015.	30
Gráfico 11. Promedios del peso en agua de la raíz. Choré – Paraguay. 2015.-	30

Índice Figuras

Figura 1. Mapas de distribución de la enfermedad en Colombia y Costa Rica. A. Mapa de distribución actual de la enfermedad en Colombia. B. Mapa de distribución de la enfermedad en Colombia para el año 2020. C. Mapa de distribución de la enfermedad en Colombia para el año 2050. D. Mapa de distribución actual de la enfermedad en Costa Rica. E. Mapa de distribución de la enfermedad en Costa Rica para el año 2020. F. Mapa de distribución de la enfermedad en Costa Rica para el año 2050.....	6
.....	6
Figura 2. Mapas de distribución de la enfermedad en Paraguay. A. Mapa de distribución actual de la enfermedad. B. Mapa de distribución de la enfermedad para el año 2020. C. Mapa de distribución de la enfermedad para el año 2050.	6
Figura 3. Morfoespecies de insectos recolectados en Paraguay en el departamento de San Pedro, Distrito de Chore, colonia Hugua Poti, Calle Che Compa.....	7
Figura 4. Insectos en los cuales se detectó el fitoplasma mediante PCR anidado y PCR en Tiempo Real. A. <i>Macunola ventralis</i> , B. <i>Typholocy binae</i> , C. <i>Hortensia similis</i> . Obtenidos en Costa Rica.....	7
Figura 5. Detección por PCR en Tiempo Real del fitoplasma 16SrIII en Costa Rica. A. Gráfica de amplificaciones por PCR en Tiempo Real. B. Tabla con valores de Ct y código de insectos colectados.....	7
Figura 6. Insecto adulto de la especie <i>Scaphytopius marginelineatus</i> colectado en el municipio de Santander de Quilichao (Cauca).	8
Figura 7. <i>Scaphytopius (convelinus) marginelineatus</i> . A. Habitus lateral. B. Vista general de la genitalia masculina en vista ventral. C. Vista general de la genitalia masculina en vista lateral. D. Detalle en vista lateral del edeago (ed). La flecha indica los procesos apicales con longitud cercana a la mitad de la longitud del tallo del edeago, ligeramente doblados o inclinados en la mitad de su largo con una diminuta espina en este punto. E. Detalle en vista ventral del conectivo y los estilos (es). La flecha inferior derecha señala la banda esclerotizada en el conectivo en su punto de unión con el edeago. F. Detalle en vista ventral del edeago. La flecha inferior indica el ápice con una abertura.	8
Figura 8. Cría de <i>Scaphytopius marginelineatus</i> en plantas de yuca y frijol. A. Amarillamiento de hojas con manchas de bordes irregulares producto de la alimentación de los insectos. B. Insectos en plantas de frijol del genotipo ICA-Pijao	8
Figura 9. Estados inmaduros del insecto <i>Scaphytopius marginelineatus</i> observados en la cría masiva.	9
Figura 10. A. Investigadores del INTA de Costa Rica realizando detecciones moleculares del fitoplasma 16SrIII mediante la técnica de qPCR en los laboratorios de fitoprotección en la ciudad de San José. B. Amplificaciones de curva estándar, se utilizaron las diluciones de gen sintético de 10.000, 1000, 100 y 10 femtomoles	10
Figura 11. Curva estándar de diluciones del gen sintético de diluciones 10.000, 1000, 100 y 10 femtomoles. R ² 96, eficiencia 102.	10
Figura 12. Investigadores de CIAT e IPTA de Paraguay realizando detecciones moleculares de fitoplasma 16SrIII mediante la técnica de qPCR en los laboratorios de Biotecnología en la estación experimental Hernando Bertoni en la ciudad de Caacupé	11
Figura 13. Amplificaciones en Tiempo Real de la curva estándar utilizando diluciones del gen sintético de 10.000, 1000, 100 y 10 femtomoles. Curva estándar de diluciones de gen sintético de diluciones 10.000, 1000, 100 y 10 femtomoles. R ² , eficiencia 102	11
Figura 14. Cámara térmica instalada en Costa Rica, en la estación de los Diamantes, en Guápiles en la provincia de Limón. A. Plantas para corte de los explantes de la cámara térmica, B. Enraizamiento de las plantas en la cámara térmica observado por investigadores del INTA. C. Bandejas de enraizamiento de explantes antes de ser llevados al campo. D. Plantas multiplicadas en cámara térmica listas para ser llevadas al campo.....	12
Figura 15. A Multiplicación masiva de semilla de yuca en cámara térmica, CIAT, Colombia. B.C. Esquejes de 20 días en enraizamiento. D. Enraizamiento de esquejes en bandejas para facilitar transporte al campo	12

Figura 16. Cámara térmica construida en Choré, Paraguay. A. Estructura de Cámara Térmica. B. Plantas macropropagadas en sustrato arena dentro de la cámara térmica.	12
Figura 17. Cosecha en parcela de incremento de material de siembra de yuca libre de la enfermedad; actividad de evaluación del rendimiento y estado fitosanitario en la parcela de la Asociación de productores del yuca del municipio de Morales (ASOYUMOR).	13
Figura 18. Material in vitro de yuca (Izquierda) y entrega del material libre de la enfermedad a agricultores del consejo comunitario del PILAMO en el municipio de Guachené (Derecha).	13
Figura 19. Siembra de plantas para incremento de material de siembra de yuca libre de la enfermedad en el Norte del Cauca, en lote de la Asociación Municipal de Usuarios Campesinos del municipio de Santander de Quilichao (izquierda) y lote del consejo comunitario del PILAMO en el municipio de Guachené (derecha).	13
Figura 20. Capacitación a grupo de agricultores pertenecientes a la asociación ASOYUMOR en el municipio de Morales (Izquierda) y a grupo de agricultores del Consejo Comunitario del PILAMO en el municipio de Guachene (Derecha).	14
Figura 21. Grupo de 40 agricultores participantes del departamento del Meta municipio de Granada en capacitación en manejo de la enfermedad del CS y macropropagación de yuca.	14
Figura 22. Entrega de 4.500 plantas de yuca a asociaciones de agricultores en mayo de 2015.	14
Figura 23. A. Entrenamiento a agricultores para reconocimiento de la enfermedad de CS en Campo en el 2013, B. Capacitación sobre CS a agricultores de Guacimo.	15
Figura 24. Curso de capacitación a técnicos y agricultores en Guapiles.	15
Figura 25. Capacitaciones realizadas en Paraguay en identificación de síntomas de CS y manejo de la enfermedad.....	15
Figura 26. Rendimiento obtenido en el genotipo de yuca Valencia con los tratamientos de inductores. Octubre 2013 y Nov 2014.	16
Figura 27. Incidencia de CS según el tratamiento con el inductor de resistencia 17	17
Figura 28. Dispersión de medias de los 23 tratamientos de las variables incidencia y peso total de las raíces de yuca en las parcelas 22	22
Figura 29. Distribución porcentual del número de raíces aparentemente sanas o con síntomas de CS en los genotipos de Yuca evaluados en los ensayos 1 (derecha) y 2 (izquierda). 23	23
Figura 30. Parcelas ensayo Resistencia Varietal a CS de Yuca. 24	24
Figura 31. Escala de evaluación de CS. (Álvarez, E. et al, 2011) 24	24
Figura 32. Datos de clima Santa Clara de San Carlos, Finca La Cacaotera. Ene – Mar 2012 25	25
Figura 33. Presencia de la enfermedad <i>Cercospora viscosae</i> (añublo pardo) en plantas de yuca..... 25	25
Figura 34. Incidencia y severidad de la enfermedad CS en genotipos de yuca. Mayo, 2013. 26	26
Figura 35. Incidencia y severidad de la enfermedad CS en genotipos de yuca. Dic, 2013..... 26	26
Figura 36. Incidencia y severidad de CS en genotipos de yuca. Segunda siembra. Dic 2014..... 27	27
Figura 37. Síntomas de CS en las raíces de Yuca..... 27	27
Figura 38. Número de raíces por planta en los genotipos de Yuca evaluados 27	27
Figura 39. Rendimiento de la yuca por genotipo evaluado en el año 2013 y 2014 27	27

Resumen Ejecutivo

El objetivo de este proyecto fue fortalecer las cadenas de valor, mejorando el bienestar socioeconómico de los productores de yuca y disminuyendo la enfermedad del Cuero de Sapo (CS) en Colombia, Costa Rica y Paraguay, a través de la implementación masiva de tecnologías innovativas que permitan optimizar la productividad, reducir el impacto del cambio climático sobre el cultivo, proteger la seguridad alimentaria y el ambiente, aplicando un esquema de investigación con participación de Universidades, productores y procesadores de yuca.

Componente 1. Analizar el impacto potencial actual y futuro del cambio climático sobre la enfermedad del CS y los vectores que la transmiten, y a la vez, plantear un estudio epidemiológico de la enfermedad en Colombia, Costa Rica y Paraguay.

Se georreferenciaron zonas de cultivos de yuca con presencia de la enfermedad del cuero de sapo en los tres países, se hizo el modelamiento de la distribución de la enfermedad; para lo cual se descargó información climática de las bases de datos WorldClim y posteriormente se generaron los mapas de distribución de la enfermedad utilizando los softwares Maxent y EcoCrop.

En zonas con presencia de CS en los tres países se recolectaron muestras vegetales e insectos de las familias Cicadellidae, Delphacidae y Membracidae, posteriormente se hicieron extracciones de ADN y detecciones moleculares del fitoplasma del grupo 16SrIII utilizando la técnica de PCR anidado con cebadores específicos y PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan®.

En **Colombia** se georreferenciaron 253 puntos de zonas con presencia y ausencia de la enfermedad en los departamentos de Cauca, Tolima, Córdoba, Sucre, Casanare, Meta, Vaupés. Se estableció la correlación de las dos zonas (con presencia y ausencia de la enfermedad), concluyéndose que factores climáticos de precipitación y temperatura están relacionados con la expresión natural de la enfermedad. Se generaron tres mapas por cada país de predicción de la distribución actual, y futura al 2020, y al 2050 de la enfermedad del Cuero de Sapo.

Se detectó el fitoplasma 16SrIII-L en el insecto *Scaphytopius marginelineatus* y se estableció la cría masiva utilizando como huésped plantas de frijol del genotipo ICA-Pijao. Se hicieron estudios de transmisión determinando el periodo de adquisición e incubación del fitoplasma por el insecto potencial vector.

En las raíces de yuca con síntomas de CS de Colombia así como en las procedentes de Paraguay y Costa Rica se detectó el fitoplasma 16SrIII-L. Adicionalmente en Costa Rica y Paraguay se detectó un fitoplasma del grupo 16SrI.

En **Costa Rica** se georeferenciaron 42 puntos de zonas con presencia y ausencia de Cuero de Sapo. Se generaron tres mapas de predicción de la distribución actual, futura al 2020, y al 2050 de la enfermedad del Cuero de Sapo.

En Costa Rica se detectó el fitoplasma 16SrIII-L en los insectos *Macunola ventralis*, *Typholocy binae* y *Hortensia similis* colectados en la provincia de Alajuela en el cantón de San Carlos identificados como vectores potenciales.

En **Paraguay** se georeferenciaron 89 puntos de las principales zonas productoras de Paraguay en las localidades de Caaguazu, Raul Arsenio Oviedo, Repatriación, Coronel Bogado, General Artigas, San Juan Bautista, Altos, Loma Grande, Nueva Colombia, Santa Elena, 1 de marzo, Itakyry, Minga Guazu, Caazapa, Maciel, General Higinio Morinigo, San Juan Nepomuceno, Ybycui, Carapegua, Concepción, Belen, Loreto, Horqueta, Yby yau, Pedro Juan Caballero, Bella vista Norte, Capitán Bado, Paso Yobai, Mauricio José Troche, San Salvador, Borja, Chore, Curuguay, Villa Ygatymi, Yhovoy, Chaco. Se generaron modelos de distribución actual de la enfermedad y futura al 2020 y al 2050.

Se colectaron 16 morfoespecies de insectos pertenecientes a las familias Cicadellidae, Membracidae y Delphacidae. En la familia Cicadellidae se detectó el fitoplasma.

Componente 2. Implementar un sistema de producción de semilla vegetativa certificada, mediante el uso de un sistema *in vitro* y de cámaras térmicas.

Se construyeron 5 cámaras térmicas con sistema automatizado PLC para regular humedad, riego y temperatura mediante la apertura y cierre de compuertas ubicadas en la parte superior del techo. Se sembró semilla vegetativa (estacas) de 5 yemas de manera horizontal utilizando como sustrato arena de río, luego de 15 días se cortaron los explantes generados y se colocaron a enraizar en bandejas utilizando como sustrato arena.

El proceso de macropropagación y limpieza duró 30 días durante los cuales las plantas crecieron a una temperatura entre 45-50°C. Al terminar el proceso de macropropagación y limpieza, las plantas fueron evaluadas por presencia o ausencia del fitoplasma utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real, estandarizada e implementada en CIAT (Colombia), INTA (Costa Rica) e IPTA (Paraguay). La técnica permite certificar el material de siembra limpio en los tres países

Se produjeron 40.520 plantas en las cámaras térmicas. Por cultivo *in vitro* a partir de yemas apicales se produjeron 6.200 plantas, y se distribuyeron a agricultores en **Colombia** y **Costa Rica**. En **Paraguay** se introdujeron 55 genotipos

de yuca in vitro y se multiplicaron en CODIPSA 5.800 plantas in vitro para su evaluación y distribución posterior a los agricultores

Componente 3. Evaluar el efecto de micronutrientes, fertilizantes y extractos vegetales sobre el comportamiento de la enfermedad del CS en variedades locales.

Se evaluaron en campo en un diseño de bloques completos al azar los inductores de resistencia: Glutathion + oligosacáridos (Kendal), Cloruro de potasio, y fertilizantes compuestos de micro y macronutrientes (Nutryphyte y Cuneb forte). En el ensayo se utilizó como fuente de inóculo material de siembra proveniente de plantas con síntomas de cuero de sapo.

Se obtuvo un incremento en el rendimiento del 20% con el uso del inductor de resistencia Kendal y una disminución en el porcentaje de incidencia de la enfermedad del 10%.

Componente 4. Seleccionar genotipos de yuca resistentes o tolerantes al CS para las zonas de estudio.

Se sembraron en cada uno de los países parcelas de yuca con 5 repeticiones, en un diseño de bloques completos al azar, utilizando como esparcidores de inóculo material de siembra proveniente de plantas enfermas con CS.

Se identificaron como tolerantes los genotipos HMC-1, Amarga (genotipo local del Departamento del Cauca) y CM 1495-7 los cuales presentaron altos rendimientos y una incidencia de Cuero de Sapo inferior al 5% y severidad grado 2. Los genotipos susceptibles fueron identificados Mcol 1505 y NIG 11 con una incidencia del 60% y alta severidad (grado 3-4).

Los genotipos de yuca Señorita, Valencia, MBra 383, CG 1450-4 y Reina (CM 6740-7) presentaron plantas con síntomas de Cuero de Sapo. El genotipo Señorita presentó la mayor incidencia más del 40% $p < 0.0001$ seguido por Valencia 30% y MBra 383 23% $p < 0.0001$.

El genotipo de yuca MPER-183 se identificó como resistente no presentó síntomas de la enfermedad del Cuero de Sapo

Fin

Fortalecer las cadenas de valor, mejorando el bienestar socioeconómico de los productores de yuca y disminuyendo la enfermedad del CS en Colombia, Costa Rica y Paraguay, a través de la implementación masiva de tecnologías innovativas que permitan optimizar la productividad, reducir el impacto del cambio climático sobre el cultivo, proteger la seguridad alimentaria y el ambiente, aplicando un esquema de investigación con participación de Universidades, productores y procesadores de yuca.

Objetivos específicos

Componente 1. Analizar el impacto potencial actual y futuro del cambio climático sobre la enfermedad del CS y los vectores que la transmiten, y a la vez, plantear un estudio epidemiológico de la enfermedad en Colombia, Costa Rica y Paraguay.

Componente 2: Implementar un sistema de producción de semilla vegetativa certificada, mediante el uso de un sistema *in vitro* y de cámaras térmicas.

Componente 3: Evaluar el efecto de micronutrientes, fertilizantes y extractos vegetales sobre el comportamiento de la enfermedad del CS en variedades locales.

Componente 4. Seleccionar genotipos de yuca resistentes o tolerantes al CS para zonas de estudio.

Metodología y actividades realizadas

Actividad 1. Analizar el impacto potencial actual y futuro del cambio climático sobre la enfermedad del CS y los vectores que la transmiten, y a la vez, plantear un estudio epidemiológico de la enfermedad en Colombia, Costa Rica y Paraguay.

Se hicieron recorridos por las principales zonas productoras de yuca en Colombia, Costa Rica y Paraguay buscando síntomas de la enfermedad del CS en raíces de más de 10 meses. Los lugares donde se encontró la enfermedad fueron georreferenciados generándose una base de datos. Posteriormente se descargó de la base de datos WorldClim toda la información climática de las zonas donde se encontró la enfermedad.

La información de clima actual se trabajó con datos históricos procedentes de la base de datos WorldClim (Hijmans *et al.* 2005, disponible en www.worldclim.org). Estos datos representan promedios de largo plazo (1950-2000) de precipitación y temperatura máxima, mínima y media mensuales, con 30 arco-segundos de resolución espacial (aproximadamente 1 km² en el Ecuador), generados a partir del método de interpolación *spline7* usando longitud, latitud y altitud como variables independientes y con datos provenientes de estaciones meteorológicas.

Entre diferentes modelos de nicho ecológico se seleccionaron Maxent y EcoCrop, el primero, por ser un algoritmo robusto de ajuste de distribuciones probabilísticas, que ha demostrado buen desempeño bajo un diverso rango de condiciones (Phillips & Dudik 2008; Elith *et al.* 2006; Hijmans & Graham, 2006) y, el segundo, por la posibilidad de involucrar parámetros de crecimiento del cultivo que permiten conocer zonas donde probablemente la enfermedad se encontrará como consecuencia de contar con características idóneas para el crecimiento del cultivo de yuca.

En los tres países se recolectaron insectos de las familias Cicadellidae, Membracidae y Delphacidae identificados previamente como posibles vectores del fitoplasma, se hizo extracción de ADN usando el protocolo propuesto por Doyle 1990. Posteriormente las muestras fueron evaluadas por PCR en tiempo real empleando una sonda Taqman[®] específica para la detección del fitoplasma 16SrIII-L (CIAT, 2013) así mismo las muestras se evaluaron también por PCR anidado empleando los cebadores P1/Tint, R16F2n/R16R2 (Lee *et al.*, 1998) y R16(III)F/R respectivamente los cuales amplifican la región del gen 16Sr y posteriormente se secuenciaron los productos de PCR.

Para la detección del agente asociado al CS se colectaron muestras de plantas de yuca con síntomas de la enfermedad en los tres países. Posteriormente se hizo extracción de ADN mediante el método propuesto por Doyle 1990. Las muestras fueron amplificadas por PCR anidado empleando los cebadores P1/Tint, R16F2n/R16R2 y R16(III)F/R respectivamente los cuales amplifican la región del gen 16Sr.

Actividad 2: Implementar un sistema de producción de semilla vegetativa certificada, mediante el uso de un sistema *in vitro* y de cámaras térmicas.

Se identificaron clones de interés y/o con potencial de desarrollo (tolerante/resistente) que ameriten los procesos de limpieza y/o multiplicación *in-vitro* para programas de disseminación. Se implementó un sistema de producción de semilla limpia a través de técnicas *in-vitro* de clones de interés/potencial; además se implementó un sistema de escalamiento en vivero y campo para aumentar la eficiencia de producción del material de siembra y apoyar programas de renovación en campo de material de siembra contaminado con la enfermedad del CS.

La cámara térmica es una estructura que con temperaturas entre 54-55°C, humedad relativa de 98% permite la limpieza y macropropagación de material de siembra de yuca. Está compuesta por una estructura de polietileno de baja densidad, sistema de riego por nebulización y dos compuertas en la parte superior para regular la temperatura; toda la estructura está controlada automáticamente por un programador lógico PLC que controla de manera automática el riego y la temperatura. Se instalaron en total cinco cámaras térmicas: tres en Colombia, una en Costa Rica y una en Paraguay. Se recolectaron en campo tallos de 12 meses, los cuales se cortaron en estacas de 5 yemas, se sembraron al interior de la cámara térmica utilizando como sustrato arena de río, se mantuvieron a una temperatura promedio de 48°C y una máxima de 55°C durante 15 días, tiempo en el cual se realizó el corte de los explantes que fueron enraizados en bandejas con sustrato arena durante 15 días (Protocolo completo Anexo 1), para entrega a los agricultores. Para garantizar que el material de siembra se encontraba libre del fitoplasma 16SrIII-L se hicieron detecciones utilizando la metodología desarrollada por Pardo *et al.*, 2013.

Actividad 3: Evaluar el efecto de micronutrientes, fertilizantes y extractos vegetales sobre el comportamiento de la enfermedad del CS en variedades locales.

Se evaluaron los inductores de resistencia: Kendal, Bion, KCL y Nutriphyte P+K en Colombia y Costa Rica utilizando los genotipos BRA 383 y Valencia respectivamente. En **Paraguay** se utilizó Kendal, KCL, Nutriphyte y Cuneb Forte (Similar en composición a Nutriphyte). Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con 5 repeticiones.

Se evaluaron las variables: Severidad de CS (escala 1-5), incidencia, peso de raíces totales, peso de raíces comerciales, Número de raíces comerciales y no comerciales y materia seca.

Actividad 4: Seleccionar genotipos de yuca resistentes o tolerantes al CS para las zonas de estudio.

En **Colombia** se seleccionaron los genotipos HMC-1, Amarga, CM 1495-7, Cumbre 3, Plateada y Algodona, CM4574-7, Per183, Roja, Mcol 1505, Negra, CM527-7, Verde y NIG 11. Son genotipos de interés debido a que se cultivan entre 900 msnm y 1700 msnm alturas que contemplan las principales zonas productoras de yuca del Cauca y Valle del Cauca. En **Costa Rica** se escogieron los genotipos MBRA 383, MPER 183, CG 1450-4 y CM 7640-7 por sus

características tipo exportación. En Paraguay se escogieron los genotipos de importancia en seguridad alimentaria y con altos contenidos de materia seca: Yubucu, Canario, Porotue, Rama Ava, Caranda'y, Tacuara, Matambre, Canó Pyta, Canó.

El ensayo de evaluación de resistencia de los genotipos de yuca se sembró en los tres países usando un diseño de bloques completos al azar con más de tres repeticiones. La evaluación se hizo a los 12 meses. Se tuvieron en cuenta las mismas variables del ensayo de inductores de resistencia.

Resultados

Componente 1. Analizar el impacto potencial actual y futuro del cambio climático sobre la enfermedad del CS y los vectores que la transmiten, y a la vez, plantear un estudio epidemiológico de la enfermedad en Colombia, Costa Rica y Paraguay.

- Desarrollo de modelos de nicho y determinación de la distribución espacial del CS:

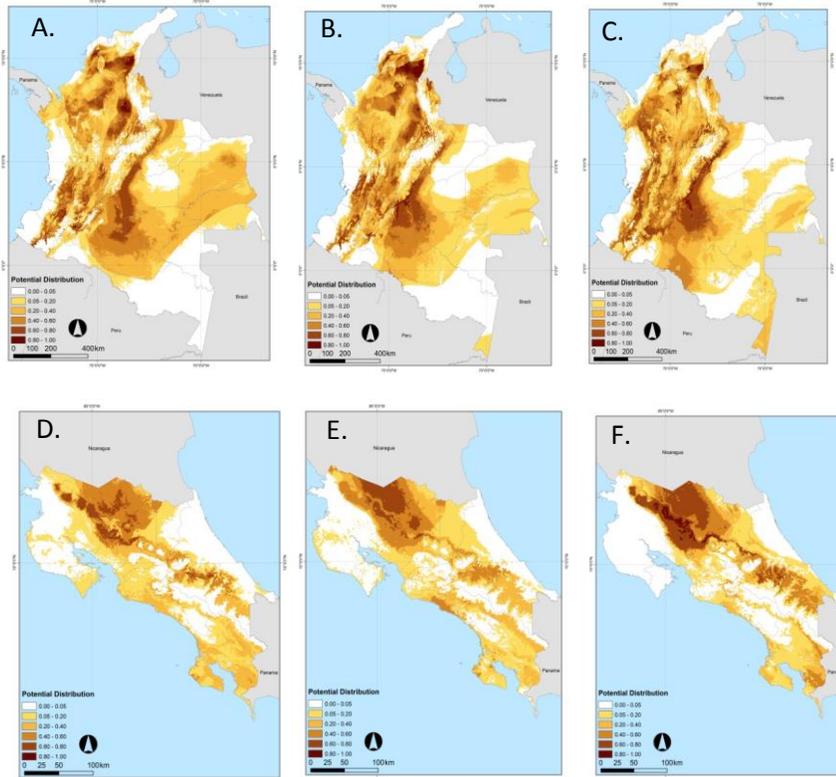


Figura 1. Mapas de distribución de la enfermedad en **Colombia y Costa Rica**. **A.** Mapa de distribución actual de la enfermedad en Colombia. **B.** Mapa de distribución de la enfermedad en Colombia para el año 2020. **C.** Mapa de distribución de la enfermedad en Colombia para el año 2050. **D.** Mapa de distribución actual de la enfermedad en Costa Rica. **E.** Mapa de distribución de la enfermedad en Costa Rica para el año 2020. **F.** Mapa de distribución de la enfermedad en Costa Rica para el año 2050.

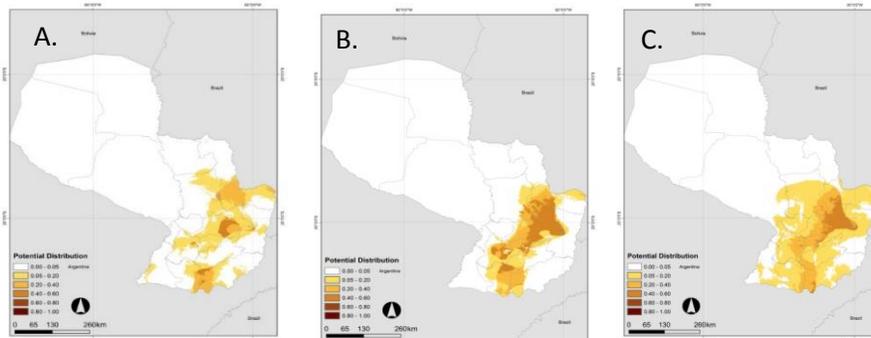


Figura 2. Mapas de distribución de la enfermedad en Paraguay. **A.** Mapa de distribución actual de la enfermedad. **B.** Mapa de distribución de la enfermedad para el año 2020. **C.** Mapa de distribución de la enfermedad para el año 2050.

- Colecta de hemípteros asociados con la transmisión del fitoplasma 16SrIII en **Paraguay**.

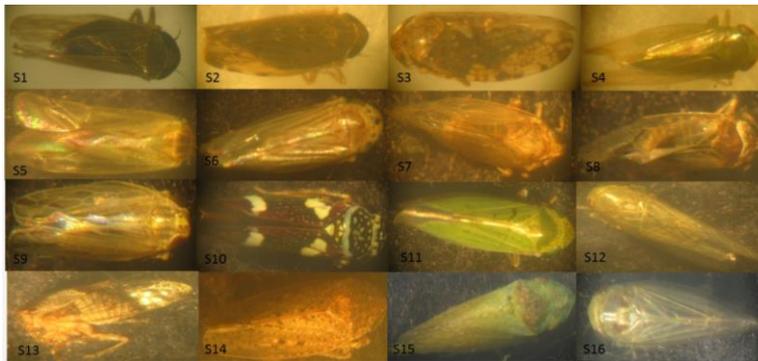


Figura 3. Morfoespecies de insectos recolectados en Paraguay en el departamento de San Pedro, Distrito de Chore, colonia Hugua Poti, Calle Che Compa.

En **Paraguay** se colectaron 16 morfoespecies. Se detectó el fitoplasma 16SrIII por PCR anidado y PCR en tiempo real en la especie *cidadelidae*.

En **Costa Rica** se colectaron 37 morfoespecies de insectos, en tres especies *Macunola ventralis*, *Typholocy binae* y *Hortensia similis* se detectó el fitoplasma por PCR anidado con los cebadores (P1/Tint, R16F2n/R16R2 y R16(III)F/R) y por PCR en Tiempo Real, estos insectos se colectaron en la provincia de Alajuela, cantón de San Carlos.



Figura 4. Insectos en los cuales se detectó el fitoplasma mediante PCR anidado y PCR en Tiempo Real. A. *Macunola ventralis*, B. *Typholocy binae*, C. *Hortensia similis*. Obtenidos en Costa Rica

- Detección de fitoplasma por PCR en Tiempo Real en insectos

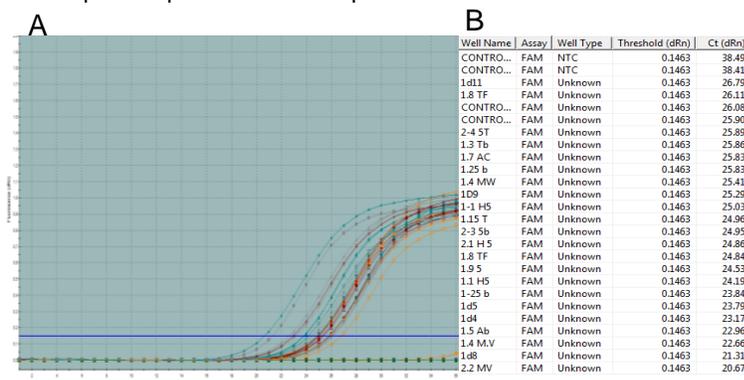


Figura 5. Detección por PCR en Tiempo Real del fitoplasma 16SrIII en Costa Rica. A. Gráfica de amplificaciones por PCR en Tiempo Real. B. Tabla con valores de Ct y código de insectos colectados.

En la **figura 5** se observan amplificaciones positivas al fitoplasma 16SrIII.

En **Colombia** se identificó como insecto vector potencial a *Scaphytopius marginelineatus* detectándose consistentemente el fitoplasma 16SrIII en esta especie de insectos colectados en cultivos de yuca infectados con CS en el municipio de Santander de Quilichao departamento del Cauca.



Figura 6. Insecto adulto de la especie *Scaphytopius marginelineatus* colectado en el municipio de Santander de Quilichao (Cauca).

Se hizo la identificación de la especie *Scaphytopius marginelineatus* observando la genitalia. **Figura 7.**

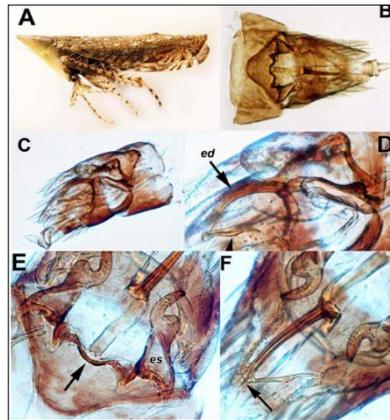


Figura 7. *Scaphytopius (convelinus) marginelineatus*. **A.** Habitus lateral. **B.** Vista general de la genitalia masculina en vista ventral. **C.** Vista general de la genitalia masculina en vista lateral. **D.** Detalle en vista lateral del edeago (ed). La flecha indica los procesos apicales con longitud cercana a la mitad de la longitud del tallo del edeago, ligeramente doblados o inclinados en la mitad de su largo con una diminuta espina en este punto. **E.** Detalle en vista ventral del conectivo y los estilos (es). La flecha inferior derecha señala la banda esclerotizada en el conectivo en su punto de unión con el edeago. **F.** Detalle en vista ventral del edeago. La flecha inferior indica el ápice con una abertura.

- Secuencias del fitoplasma 16SrIII registrada en el Banco de genes (USA), obtenidas a partir de ADN de *Scaphytopius marginelineatus* amplificado con los cebadores R16(III)F2/R16(III)R1 (Lapage *et al.*, 1992).

KP759897, KP759898, KP759899, KP759900, KP759901, KP759902

- Se estableció la cría masiva de *Scaphytopius marginelineatus* para el ensayos de transmisión, se determinó el periodo de adquisición e incubación del fitoplasma.

Se colectaron insectos de la especie *Scaphytopius marginelineatus* en la estación del CIAT ubicada en Santander de Quilichao. Se utilizaron redes manuales de captura, posteriormente los insectos del género *Scaphytopius* se separaron del resto de insectos utilizando aspiradores manuales. Los insectos se colocaron en jaulas con malla antiáfidos y se utilizó como planta huésped el genotipo de yuca SM 909-25 de 1 mes de edad. Una vez se observaron estados inmaduros del insecto y síntomas de alimentación en las plantas de yuca (**Figura 8A**) se cambió el huésped por frijol del genotipo ICA-Pijao, en la cual se multiplica el insecto más rápido (**Figura 8B**).



Figura 8. Cría de *Scaphytopius marginelineatus* en plantas de yuca y frijol. **A.** Amarillamiento de hojas de yuca con manchas de bordes irregulares producto de la alimentación de los insectos. **B.** Insectos en plantas de frijol del genotipo ICA-Pijao.

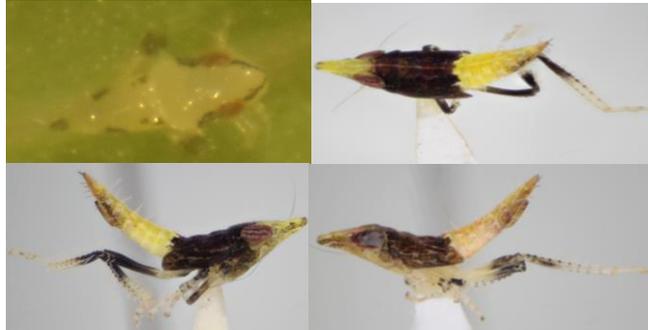


Figura 9. Estados inmaduros del insecto *Scaphytopius marginelineatus* observados en la cría masiva.

- Desarrollo de técnicas de PCR anidado y qPCR para la detección del fitoplasma asociado al CS en Colombia, Costa Rica y Paraguay.

Se colectaron raíces de plantas de yuca con síntomas de la enfermedad de CS en Colombia, Costa Rica y Paraguay. Mediante las técnicas de PCR anidado y PCR en Tiempo Real se detectó el fitoplasma del grupo 16SrIII identificado por secuenciación. En la tabla 1 se presentan las secuencias reportadas en el Banco de Genes

Cuadro 1. Reacción por PCR anidado y qPCR de las muestras de raíces de yuca con CS colectadas en Colombia, Costa Rica y Paraguay.

Código muestra	Nested PCR	qPCR	Accesión Gen Bank	País
6	+	+	KF701517	Colombia
19	+	+	KF701516	Colombia
7	+	+	KF701515	Colombia
3	+	+	KF701514	Colombia
33	+	+	KF701512	Colombia
15	+	+	KF701511	Colombia
21	+	+	KF701510	Colombia
10	+	+	KF701509	Colombia
29	+	+	KF701508	Colombia
1	+	+	KF701507	Colombia
17	+	+	KF701506	Colombia
28	+	+	KF701505	Paraguay
13	+	+	KF701504	Paraguay
4	+	+	KF701503	Paraguay
10*	+	+	KF701502	Paraguay
32	+	+	KF701501	Paraguay
48	+	+	KF701499	Paraguay
2	+	+	KF701498	Paraguay
34	+	+	KF701497	Paraguay
26	+	+	KF701496	Paraguay
19	+	+	KF701495	Paraguay
30	+	+	KF701494	Paraguay
2	+	+	KF701493	Paraguay
16	+	+	KF701492	Paraguay
5	+	+	KF701491	Paraguay
4	+	+	KF701490	Paraguay
23	+	+	KF701489	Paraguay
22	+	+	KF701488	Paraguay
35	+	+	KF701487	Paraguay
27	+	+	KF701486	Paraguay
25	+	+	KF701485	Paraguay
36	+	+	KF701484	Paraguay
27	+	+	KF418785	Paraguay
22	+	+	KF418786	Paraguay
22*	+	+	KF581157	Paraguay
16	+	+	KF418787	Paraguay
33*	+	+	KF418788	Paraguay

15	+	+	KF418789	Paraguay
10	+	+	KF581153	Paraguay
20*	+	+	KF581156	Paraguay
28	+	+	KF581154	Paraguay
24	+	+	KF581155	Paraguay
45	+	+	KC999115	Colombia
40	+	+	EU346761.1	Colombia
39	+	+	AY737646.1	Colombia
33	+	+	AY737647.1	Colombia
49	+	+	KC999116	Colombia
55	+	+	KC816736.1	Colombia
44	+	+	KC816736.1	Costa Rica
1	+	+	KC283218	Paraguay 16Srl

Estandarización de condiciones de PCR en Tiempo Real en Colombia, Costa Rica y Paraguay.

La implementación de la técnica de PCR en Tiempo Real para la detección del fitoplasma 16SrlII en los tres países va a permitir certificar que el material llevado al campo y los bancos de germoplasma de yuca de los tres países se encuentran libres del fitoplasma asociado con la enfermedad CS.

En Colombia, Costa Rica y Paraguay, se hizo la capacitación a personal del INTA e IPTA en:

- ✓ Cuidados y manipulación de los reactivos utilizados para PCR en Tiempo Real .
- ✓ Manipulación y programación del equipo de PCR en Tiempo Real StepOne Plus (Applied Biosystems).
- ✓ Elaboración de la curva estándar para cuantificación relativa y determinación de reproducibilidad de los reactivos.
- ✓ Utilización de genes sintéticos para la construcción de la curva estándar y de controles positivos, para evitar el proceso de clonación de amplicones previamente obtenidos.
- ✓ Diagnóstico de las muestras vegetales de campo e insectos.
- ✓ Detección de fitoplasma 16SrlII asociado con la enfermedad del Cuero de sapo en yuca.

La capacitación se hizo en la ciudad de San José, en el laboratorio de sanidad vegetal del INTA.

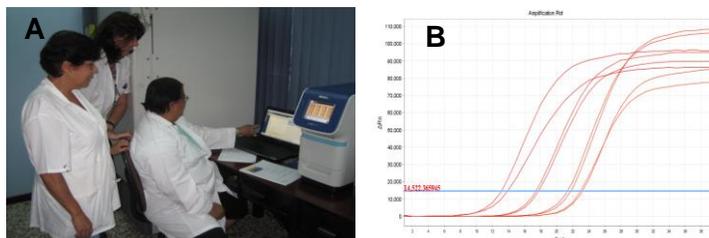


Figura 10. A. Investigadores del INTA de Costa Rica realizando detecciones moleculares del fitoplasma 16SrlII mediante la técnica de qPCR en los laboratorios de fitoprotección en la ciudad de San José. **B.** Amplificaciones de curva estándar, se utilizaron las diluciones de gen sintético de 10.000, 1000, 100 y 10 femtomoles.

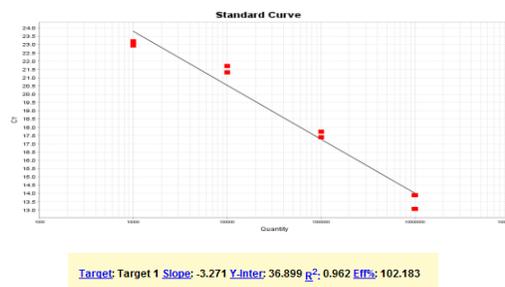


Figura 11. Curva estándar de diluciones del gen sintético de diluciones 10.000, 1000, 100 y 10 femtomoles. R² 96, eficiencia 102.

Se hizo la capacitación y estandarización de las condiciones de PCR en Tiempo Real para la certificación de semilla de yuca en los laboratorios de Biotecnología en la estación experimental Hernando Bertoni en la ciudad de Caacupé.



Figura 12. Investigadores de CIAT e IPTA de Paraguay realizando detecciones moleculares de fitoplasma 16SrIII mediante la técnica de qPCR en los laboratorios de Biotecnología en la estación experimental Hernando Bertoni en la ciudad de Caacupé.

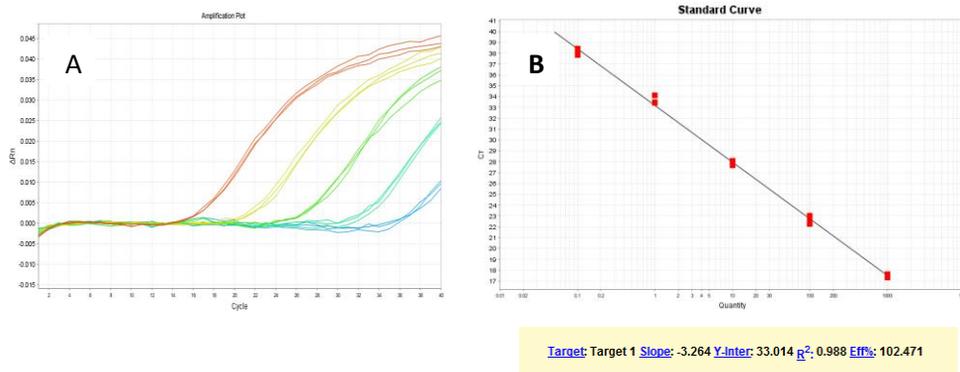


Figura 13. Amplificaciones en Tiempo Real de la curva estándar utilizando diluciones del gen sintético de 10.000, 1000, 100 y 10 femtomoles. Curva estándar de diluciones de gen sintético de diluciones 10.000, 1000, 100 y 10 femtomoles. R², eficiencia 102.

Componente 2: Implementar un sistema de producción de semilla vegetativa certificada, mediante el uso de un sistema *in vitro* y de cámaras térmicas.

- Fortalecer en cada país un sistema de producción de plantas *in vitro* mediante la técnica de propagación a través de yemas apicales.

Costa Rica: Se hizo la producción de semilla de yuca a partir de plantas *in vitro*, el método de micropropagación utilizado permitió multiplicar con éxito los explantes de yuca de todos los genotipos, en total se reprodujo CG-1450-1(82), CUB-75 (59), CM7033-3 (86), SM-1433-4 (72), CM-2766-5 (86), COL-2063 (90), PER-183(90), SM-1821-7(96), CM-4919-1(36), SM-909-25(10), TAI-8 (57), CM-7951-5 (80), CM-7514-8 (80). En el genotipo Valencia se obtuvo material *in vitro* 1750 y 3220 en cámara térmica, 1300 plantas fueron sembradas en campo en la Estación los Diamantes en Guápiles. Se hicieron 3 talleres para capacitar técnicos y agricultores en técnicas de propagación (30 personas). Se hizo transferencia del método de endurecimiento de vitroplantas, establecido por Clayuca que permitió producir plantas con el desarrollo adecuado para ser llevadas al campo.



Figura 14. Cámara térmica instalada en Costa Rica, en la estación de los Diamantes, en Guápiles en la provincia de Limón. **A.** Plantas para corte de los explantes de la cámara térmica, **B.** Enraizamiento de las plantas en la cámara térmica observado por investigadores del INTA. **C.** Bandejas de enraizamiento de explantes antes de ser llevados al campo. **D.** Plantas multiplicadas en cámara térmica listas para ser llevadas al campo.

Colombia: Se produjeron cerca de 37.500 plantas bajo el sistema de cámaras térmicas y 8.000 plántulas mediante la técnica de multiplicación de yemas apicales. El sistema de propagación en Cámara térmica se presenta en la **figura 15**



Figura 15. **A** Multiplicación masiva de semilla de yuca en cámara térmica, CIAT, Colombia. **B.C.** Esquejes de 20 días en enraizamiento. **D.** Enraizamiento de esquejes en bandejas para facilitar transporte al campo.

Paraguay: En el laboratorio de Biotecnología del Centro de investigación Hernando Bertoni (CIHB) situado en Caacupé se implementó un sistema de producción de semilla vegetativa mediante las técnicas de cultivo in vitro, donde se producen plantas madres para la macropropagación en cámara térmica, actualmente se están multiplicando cuatro genotipos que fueron seleccionados por su alto rendimiento y tolerantes a las principales enfermedades que afectan al cultivo de yuca en el país.

En el Campo experimental de Choré se instaló la cámara térmica, se hizo la macropropagación de semillas de yuca sana, para proveer a los productores con semillas de alta calidad genética y sanitaria. En este campo se mantiene la colección de genotipos nacionales.

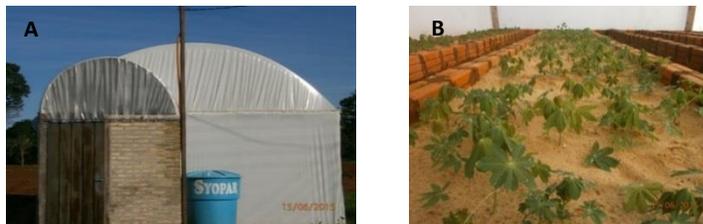


Figura 16. Cámara térmica construida en Choré, Paraguay. **A.** Estructura de Cámara Térmica. **B.** Plantas macropropagadas en sustrato arena dentro de la cámara térmica.

- Capacitar a los productores para implementación de nuevas tecnologías.

En **Colombia** se construyeron 3 cámaras térmicas para la producción de semilla vegetativa certificada, la cámara maneja una temperatura entre 50-55°C. Para la multiplicación de material se utilizó la técnica de macro propagación utilizando estacas de 5 nudos, de las cuales se obtienen 5 explantes pasados 15 días, éstos son enraizados dentro de la cámara térmica utilizando como sustrato arena de río.

Hasta el momento se han producido 37.500 plantas en cámara térmica y por la técnica *in vitro* de cultivo de yemas apicales 4.500 plantas, las cuales se distribuyeron a agricultores del Departamento del Cauca y Llanos orientales. El material distribuido se cosechó con los agricultores de las asociaciones y se evaluó el rendimiento por planta, la calidad comercial de las raíces y la sanidad mediante visualización de síntomas en raíces (Figura 19). Los resultados indicaron una incidencia de 0% de plantas con síntomas de cuero de sapo. Las plantas que presentaron los mejores rendimientos fueron seleccionadas para el establecimiento de nuevos lotes de incremento, que serán fuente de material de siembra para las zonas en Colombia.



Figura 17. Cosecha en parcela de incremento de material de siembra de yuca libre de la enfermedad; actividad de evaluación del rendimiento y estado fitosanitario en la parcela de la Asociación de productores del yuca del municipio de Morales (ASOYUMOR).

Adicionalmente se produjeron 4500 nuevas plantas por la técnica *in vitro*, que se distribuyeron a agricultores en los Departamentos Cauca y Meta en Colombia (Figuras 20, 21, 22, 23). Los genotipos entregados fueron: SG 427-64, COL 2061, SM 707-17, COL 1522, CM 6438-14, PER 183, CM 2766-5, CG 1450-4.



Figura 18. Material *in vitro* de yuca (Izquierda) y entrega del material libre de la enfermedad a agricultores del consejo comunitario del PILAMO en el municipio de Guachené (Derecha).



Figura 19. Siembra de plantas para incremento de material de siembra de yuca libre de la enfermedad en el Norte del Cauca, en lote de la Asociación Municipal de Usuarios Campesinos del municipio de Santander de Quilichao (izquierda) y lote del consejo comunitario del PILAMO en el municipio de Guachené (derecha).

Se capacitaron 53 agricultores del Cauca de las regiones de Guachene y Morales, en técnicas de macropopagación y selección de material de siembra libre de Cuero de Sapo.

Adicionalmente se hicieron tres capacitaciones: una en el municipio de Morales (15 personas), otra en el municipio de Santander de Quilichao (ocho personas) y la tercera en el municipio de Guachene (15 personas), en el tema de

producción de material de siembra sano para el manejo de la enfermedad en yuca, reconocimiento de síntomas de la enfermedad de cuero de sapo y su manejo, clones mejorados disponibles para cada zona y su potencial uso, uso de hidro-retenedor para conservar la humedad en el suelo como estrategia ante eventos adversos de cambio climático por sequía en las zonas (Figura 21).

El material de siembra entregado a los agricultores cuenta con el certificado fitosanitario, expedido por el laboratorio de germoplasma del CIAT y el permiso de movilización otorgado por el Instituto Colombiano Agropecuario que es la entidad de vigilancia fitosanitaria en Colombia.



Figura 20. Capacitación a grupo de agricultores pertenecientes a la asociación ASOYUMOR en el municipio de Morales (Izquierda) y a grupo de agricultores del Consejo Comunitario del PILAMO en el municipio de Guachene (Derecha).

El material de siembra fue evaluado mediante técnica de PCR en tiempo real para confirmar el estado sanitario del mismo.



Figura 21. Grupo de 40 agricultores participantes del departamento del Meta municipio de Granada en capacitación en manejo de la enfermedad del CS y macropropagación de yuca.

El INTA (Costa Rica) hizo la capacitación de agricultores semilleros en el que participaron 15 agricultores líderes de sus agrupaciones, a los mismos se les hizo entrega de 4.500 semillas de yuca (multiplicadas en cámaras térmicas) para su posterior entrega a sus asociados, además se les hizo entrega de folleto que incluye información del manejo de la semilla y la enfermedad el cual está titulado “Manejo de semilla de calidad y de la enfermedad de cuero de sapo en el cultivo de yuca”

Se hicieron 3 talleres de capacitación a técnicos y agricultores sobre la técnica de propagación para un total de 30 personas. Se hizo transferencia del método de endurecimiento de vitroplantas, establecido por Clayuca que permitió producir plantas con el desarrollo adecuado para llevarlas al campo.



Figura 22. Entrega de 4.500 plantas de yuca a asociaciones de agricultores en mayo de 2015.



Figura 23. A. Entrenamiento a agricultores para reconocimiento de la enfermedad de CS en Campo en el 2013, **B.** Capacitación sobre CS a agricultores de Guacimo.



Figura 24. Curso de capacitación a técnicos y agricultores en Guapiles.

En Paraguay

- a) Capacitación de un investigador en técnicas moleculares para la detección del microorganismo asociado a la enfermedad de CS en yuca e identificación de insectos vectores CIAT- Colombia 9 al 20 Abril, 2012
- b) Capacitación de tres investigadores sobre síntomas y manejo de la enfermedad CS INTA-Costa Rica 14 al 18 de Julio, 2014.
- c) Capacitación de un investigador en análisis de ADN de insectos INTA-Costa Rica 21 al 25 de Julio, 2014.
- d) Asesoramiento de un especialista del CIAT al laboratorio de biotecnología para la puesta a punto del protocolo de PCR en tiempo Real para la detección del fitoplasma asociado a la enfermedad CS Caacupé-Paraguay 18 al 23 de Mayo de 2015.
- e) Capacitación a técnicos, líderes productores y a estudiantes de diferentes departamentos donde se realizaron jornadas técnicas sobre la enfermedad de CS en yuca, a fin de informar y fortalecer los conocimientos del tema.

La capacitación se realizó en las siguientes localidades:

En el Dpto. de Itapúa, Gral. Artigas en la compañía Ñu Pyahú, en la finca del Sr. Espinola, donde participaron 62 Hombres y 4 Mujeres

Dpto. de Paraguari, Ybycuí, en la escuela Agrícola donde se tuvo la participación de 52 hombres y 7 mujeres.

Dpto. de San Pedro, Choré, Campo Experimental de Choré donde participaron 27 hombres y 26 mujeres.

Dpto. Caaguazú, Cnel. Oviedo, Universidad Católica de Asunción, con la participación de 74 hombres y 27 mujeres.

Dpto. de Cordillera, Caacupé, Centro de Investigación Hernando Bertoni, con la participación de 40 hombres y 48 mujeres. En total se capacitaron a 367 productores, estudiantes y extensionistas, Los expositores fueron los Ing. Agr. Vicente Mangano, Ada Torres, Mirian Trabuco y Marta Zacher.



Figura 25. Capacitaciones realizadas en Paraguay en identificación de síntomas de CS y manejo de la enfermedad.

Componente 3. Evaluar el efecto de micro-nutrientes y extractos vegetales como fertilizantes sobre el comportamiento de la enfermedad en variedades locales susceptibles.

Costa Rica: El estudio se hizo en Santa Clara de San Carlos, en la finca La Cacaotera de la empresa PCI – Rojas y Madrigal S: A. 300 Norte de la plaza de Deportes de Santa Clara de San Carlos: 10°21'45.47" Norte y 84° 31'01.80" Oeste. El estudio se realizó en el período comprendido de Marzo 2011 a Diciembre del 2014.

El área de siembra constituida por parcelas de aproximadamente 5 metros de largo * 5 metros de ancho. En el centro de la parcela se sembraron los genotipos de yuca descritos en el **cuadro 2** de plantas sin síntomas de CS y en los bordes se sembraron estacas de yuca provenientes de plantas afectadas por CS del genotipo Valencia "mejorada" (inóculo). En total se emplearon 15 plantas de yuca como unidad experimental (Ver Figura 1).

Cuadro 2. Tratamientos con inductores de resistencia evaluados en el cultivo de yuca.

Tratamiento	Composición	Dosis/ha	Frecuencia Aplicación
Bion 50 WG	Acibenzolar-S-Methy	0.17 kg/Ha	Tratamiento de semilla en inmersión por 10 minutos (0.2L/200L), Luego c/15 días después de la siembra
Kendal	Glutathion + Oligosaccharines	3L/Ha	Tratamiento de semilla en inmersión por 10 minutos (2L/200L), Aplicar cada 10 días después de la siembra
Nutriphyte P+K	Fósforo + Potasio	1.5L/200L	Tratamiento de semilla en inmersión por 10 minutos (2L/200L), Aplicar cada 10 días después de la siembra.
KCL	Cloruro de Potasio	39 g/planta	30 y 60 días después de la siembra
Testigo	No aplicación de inductores		

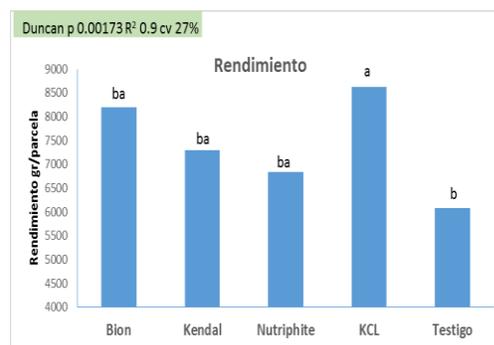
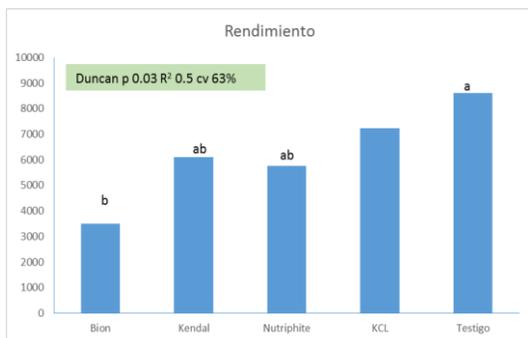


Figura 26. Rendimiento obtenido en el genotipo de yuca Valencia con los tratamientos de inductores. Octubre 2013 y Nov 2014.

La enfermedad CS, no se presentó en el primer año de estudio, en ninguno de los tratamientos evaluados. A pesar de ello, hubo diferencias entre tratamientos con relación a rendimiento. El tratamiento testigo así como el KCL mostró los mayores rendimientos, el tratamiento Bion presentó un efecto de Fitotoxicidad. Por lo cual se resembró con nuevas plantas, el atraso del cultivo pudo influir en la reducción del rendimiento. Las diferencias en rendimiento se concluyó obedecieron más al efecto de fertilizante del tratamiento KCL que a su capacidad de inducir resistencia. En el segundo ensayo, no se presentó la enfermedad CS y la incidencia fue muy baja (Figura 27) con relación al ensayo de evaluación de germoplasma establecido en la misma fecha de cultivo. Los tratamientos de Bion y KCL fueron de mayor rendimiento seguidos por el Kendal y Nutriphyte. Las plantas con CS tienden a concentrar almidones (azúcares) en este caso el KCL contribuye con procesos metabólicos de almacenamiento de carbohidratos que ayudan a mantener alta producción. En la Figura 26, se observa que después del segundo año de cultivo continuo y bajo presión de inóculo, la enfermedad se presentó con mayor incidencia en el tratamiento Bion seguido del KCL ambos diferentes estadísticamente respecto al testigo que presentó la menor incidencia de la enfermedad.

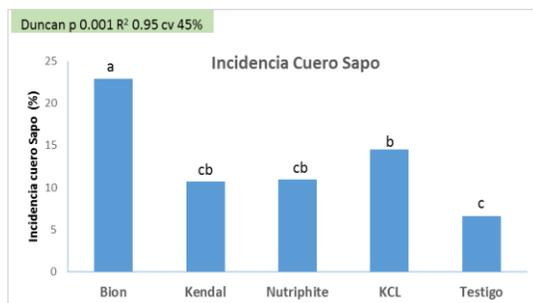


Figura 27. Incidencia de CS según el tratamiento con el inductor de resistencia.

Paraguay: El experimento fue establecido en mayo de 2014 en el Campo Experimental de Choré, ubicado en el distrito de Choré, departamento de San Pedro, cuyas coordenadas se sitúan aproximadamente entre 24° 10' latitud Sur y 57° 36' longitud Oeste, altitud 250 metros msnm.

El material genético utilizado como planta sana correspondió al genotipo Tacuara Hú y como planta enferma utilizada como borde entre los tratamientos el genotipo Tapojo'a Pyta.

Tratamientos utilizados en el experimento. Choré – Paraguay. 2015: T1= Kendall (Glutathione + oligosaccharines), T2 = Cuneb forte (32% de P+24 % de K), T3 = KCl (60% de K), T4= Testigo (sin inductores)

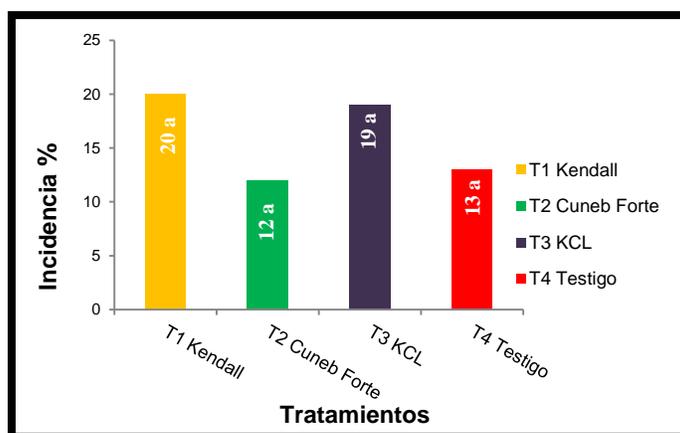


Gráfico 1. Promedios de la incidencia de la enfermedad. Choré – Paraguay. 2015

Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Se pudo observar que la incidencia de CS fue menor utilizando el producto Cuneb Forte con relación al KCL, Kendall y al testigo.

A- Cantidad de raíz comercial de yuca (*Manihot esculenta*)

El análisis de varianza ANOVA (Test F 5%) efectuado, correspondiente al número de raíz comercial se presenta en la tabla 3 y los promedios obtenidos que fueron comparados a través de Test de Tukey al 5% se pueden observar en el cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis de varianza correspondiente a la cantidad de raíz comercial. Choré - Paraguay. 2015

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	47.4375	15.8125	0.2003	0.894
Bloques	4	839.09766	209.7744	2.6574	0.085
Error	12	947.26953	78.93913		
Total	19	1833.8047			
DMS	12.24				

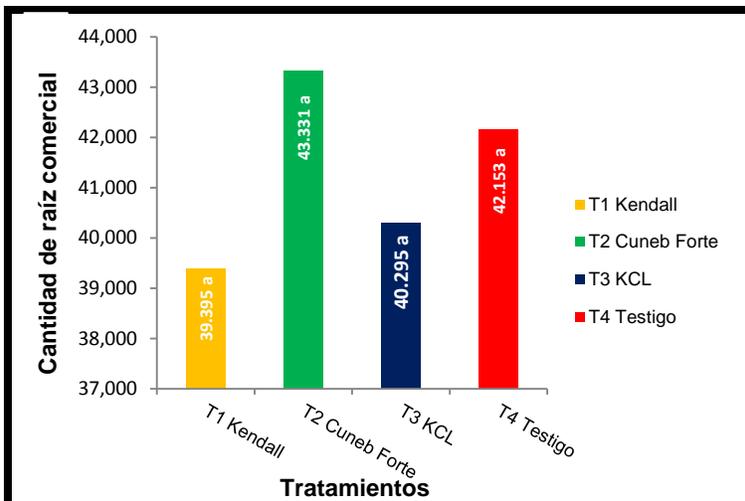


Gráfico 2. Promedios del número de raíz comercial. Choré – Paraguay. 2015

Los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas para esta variable, siendo las diferencias porcentuales entre el Cuneb Forte comparado con el Testigo, KCL y Kendall de 3%; 7% y 9% respectivamente.

B- Número de raíz no comercial de yuca (*Manihot esculenta*)

Cuadro 4. Análisis de varianza correspondiente a la cantidad de raíz no comercial. Choré - Paraguay 2015

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	56.916992	18.97233	0.6282	0.613
Bloques	4	88.727539	22.18189	0.7345	0.588
Error	12	362.39356	30.19946		
Total	19	508.03809			
DMS		7,57			

El análisis de varianza efectuado para esta variable se presenta en el **Cuadro 4** y los datos correspondientes a los promedios obtenidos se presentan en el **Gráfico 3**.

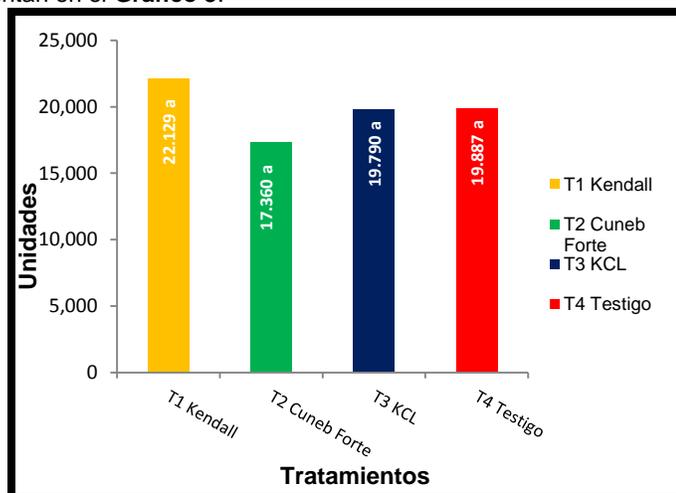


Gráfico 3. Promedios del número de raíz no comercial. Choré – Paraguay. 2015

Como se puede observar el Kendall fue el que presentó un mayor valor para este parámetro, seguido del Testigo, KCL y finalmente el Cuneb Forte. El Test de Tukey al 5% no detectó diferencias significativas entre los mismos.

C- Peso de raíz comercial de yuca (*Manihot esculenta*)

En el **Cuadro 5** se puede observar el análisis de varianza ANOVA (Test F 5%) y la comparación de medias a través de Test de Tukey al 5% correspondiente a la incidencia de la enfermedad se presentan en el **Gráfico 4**.

Cuadro 5. Análisis de varianza correspondiente al peso de raíz comercial. Choré - Paraguay. 2015

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	157.576172	52.525391	0.6749	0.586
Bloques	4	979.011719	244.75293	3.1449	0.055
Error	12	933.912109	77.826012		
Total	19	2070.5			
DMS	12,16				

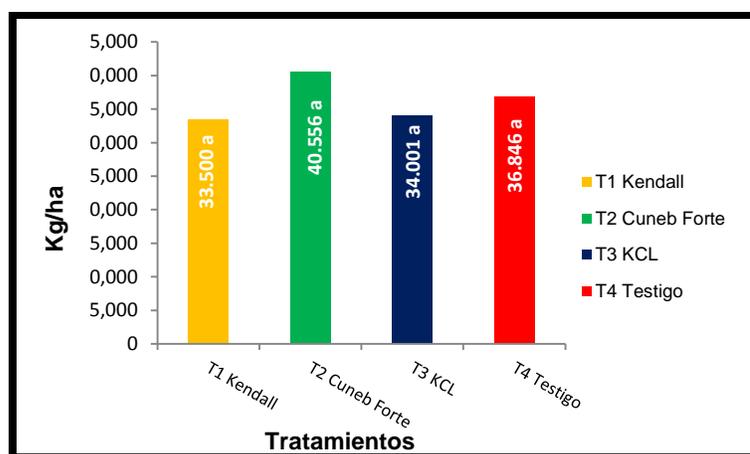


Gráfico 4. Promedios del peso de raíz comercial. Choré – Paraguay. 2015

Los resultados obtenidos mostraron efectos estadísticamente similares siendo el Cuneb Forte el que produjo mayor rendimiento de raíces cuyas diferencias de rendimientos son 3.710 Kg/ha Testigo; 6.555 Kg/ha KCL y 7.056 Kg/ha Kendall.

D- Peso de raíz no comercial de yuca (*Manihot esculenta*)

Los promedios y el resultado obtenido a través del Test de Tukey 5% realizado para este parámetro se presentan en el Gráfico 5 y el análisis de varianza ANOVA en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Análisis de varianza correspondiente al peso de raíz no comercial. Choré - Paraguay. 2015

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	0.403503	0.134501	0.0947	0.961
Bloques	4	6.539825	1.634956	1.1511	0.38
Error	12	17.04434	1.420362		
Total	19	23.98767			
DSM	1,64				

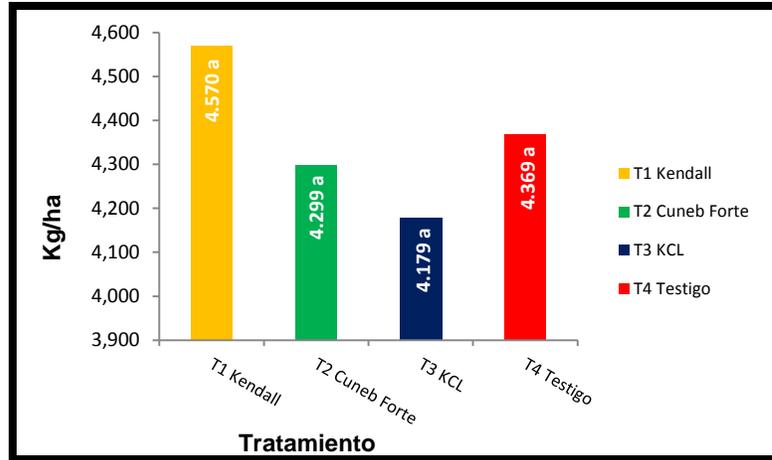


Gráfico 5. Promedios del peso de raíz no comercial. Choré – Paraguay. 2015

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticas significativas al comparar los tratamientos con inductores y el testigo. El tratamiento con Kendal mostró mayor rendimiento de raíz no comercial, los valores diferenciales con relación a este inductor fueron los siguientes: Testigo 201 Kg/ha; Cuneb Forte 271Kg/ha y KCl 391 Kg/ha.

E- Peso de raíz al agua de yuca (*Manihot esculenta*)

Cuadro 7. Análisis de varianza correspondiente al peso de raíz en agua. Choré - Paraguay. 2015

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	9325	3108.3333	3.8854	0.037
Bloques	4	58770	14692.5	18.3656	0
Error	12	9600	800		
Total	19	77695			
DMS	12.3				

Los datos presentados en el **Cuadro 7** corresponden al análisis de varianza ANOVA. En el **Gráfico 6** se presentan los promedios y el resultado de Tukey al 5%.

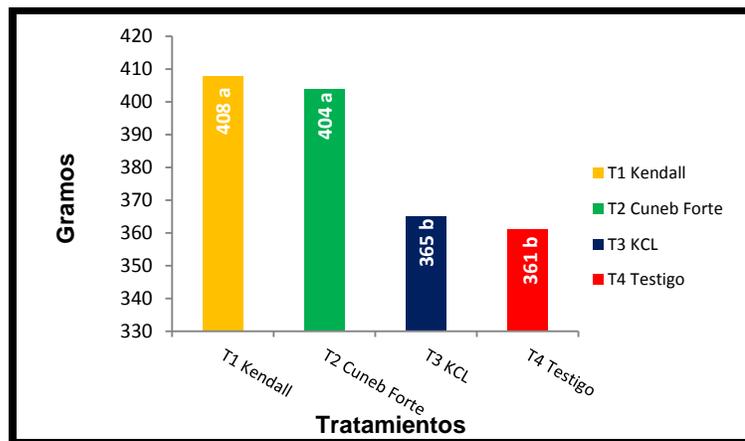


Gráfico 6. Promedios de peso de raíz en agua. Choré – Paraguay. 2015

En cuanto a la influencia de los inductores Kendal y Cuneb Forte en el estudio sobre el peso de raíz en agua no hubo diferencias significativas entre ellos, como también entre el KCl y el Testigo.

Entre los inductores Kendal y Cuneb Forte comparados con el KCl y Testigo si hubo diferencias significativas estadísticamente.

Colombia: El experimento se estableció en Santander de Quilichao (Cauca) en la estación experimental del CIAT en un diseño de bloques completamente al azar con 5 repeticiones utilizando como unidad experimental parcelas de 15 plantas del genotipo BRA 383.

Cuadro 8. Promedios para las variables productivas de plantas de yuca tratadas con Inductores de resistencia durante su ciclo productivo en el ensayo realizado durante el 2014.

Tratamiento		Peso total de raíces	Peso de raíces comerciales	Materia seca	No. de raíces comerciales	Incidencia de CS
		Kg				
T1	KCl (390 kg.ha-1)	20.4cbd	5.9bcde	17.40c	10.40bcdefg	18.04
T2	KCl (780 kg.ha-1)	21bcd	6.6bcde	17.87abc	9.20cdgfe	13.7
T3	KCl (190 kg.ha-1)	16.6dc	4.4bcde	17.60abc	7.60dgfe	6.22
T4	KCl (390 kg.ha-1)	12.9d	2.4de		3.6g	12.16
T5	Kendal® (2400 mL/ha) cada 20 días	43a	19.6a	18.07abc	28.00ab	0
T6	Kendal® (4800 mL/ha) cada 10 días	37.4ab	15.9ab	17.96abc	21.20abcdefg	30.47
T7	Kendal® (2400 mL/ha) cada 10 días	48.1a	19.7a	17.99abc	25.00abcdef	1.78
T8	Kendal® (4800 mL/ha) cada mes	33.3abc	14.7abc	17.89abc	18.20abcdefg	21.94
T9	Kendal® (4800 mL/ha) cada 10 días	30.82abcd	14.5abcd	18.08acb	17.2abcdefg	11.69
T10	Boost (133.33 gr/ha) cada 15 días	13.3dc	3cde	17.52abc	5.6g	4.61
T11	Boost (266.6 gr/ha) cada 15 días	11.5d	1.8e	17.45bc	4.00g	3.33
T12	Boost + Kendal® 133.33 gr/ha) + (2400 mL/ha)	17.9dc	4.9bcde	17.71abc	8.00defg	27.24
T13	Control Negativo	13.6d	3.5cde	17.56abc	6.80gf	9.52
T14	Nutri-phite® (20L /ha) todo el ciclo	42.8a	14.8abc	18.00abc	26.75abc	28.94
T15	Nutri-Phite® (10L /ha)	46.9a	22.9a	18.27a	34.4a	2.85
T16	Nutri-Phite® (33.33L/ha)	44.9a	21.1a	18.22ab	26.40abcd	16.74
T17	Nutri-Phite® + KCl (5.20 Kg/ha + 20L /ha)	40.1a	20a	18.06abc	25.4abcde	8.66
T18	NPK (15-15-15) (200 Kg/ha)	18.2bcd	4.5bcde	17.65abc	8.6cdefg	5.16
T19	NPK (15-15-15) (350 Kg/ha)	19.5bcd	4.6bcde	17.45bc	8.75cdefg	19.83
T20	Nutri-Phite® + Kendal® ((2400 mL/ha) + (20L /ha)	46.8a	19.3a	18.07abc	25.00abcdef	17.45
T21	Aliette® (2 Kg/ha)	21bcd	6.3bcde	17.79abc	11.80bcdefg	17.45
T22	Aliette® (2,40 Kg/ha)	18.7bcd	5.7bcde	17.55abc	9.20cdgfe	9.33
T23	Aliette® (2,8 Kg/ha)	20.1bcd	4.3bcde	17.63abc	9.00cdefg	15.97

* Valores seguidos por las mismas letras no difieren significativamente, de acuerdo a la prueba de rango múltiple de R-E-G-W (P<0.05)

Ensayo inductores de resistencia

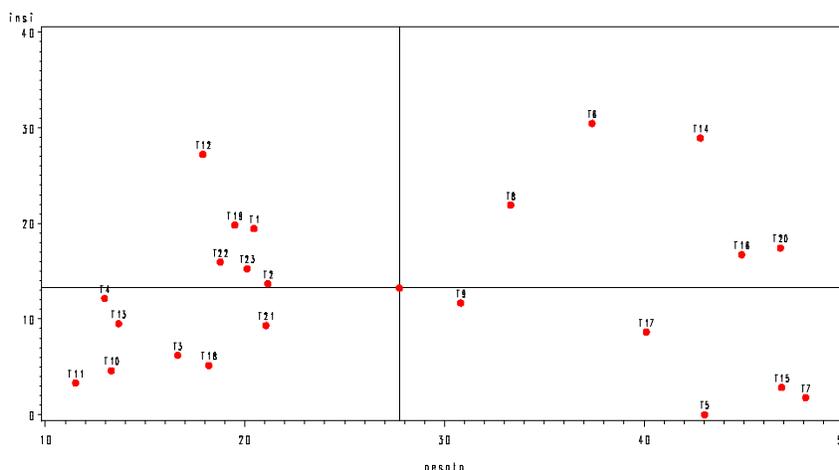


Figura 28. Dispersión de medias de los 23 tratamientos de las variables incidencia y peso total de las raíces de yuca en las parcelas.

Componente 4: Seleccionar genotipos de yuca resistentes o tolerantes al CS para las zonas de estudio.

Colombia: Se hizo la evaluación de los genotipos de yuca por su resistencia a CS determinando los síntomas en campo y la calidad de las raíces.

Los resultados obtenidos en el ensayo se presentan en los cuadros 10 y 11. El ensayo 1 corresponde a los genotipos HMC-1, Amarga, CM 1495-7, Cumbre 3, Plateada y Algodona (**Cuadro 9**) y en el ensayo 2 los genotipos CM4574-7, Mper183, Roja, Mcol 1505, Negra, CM527-7, Verde y NIG 11 (**Cuadro 10**).

Cuadro 9. Promedios para las variables productivas y variables de la enfermedad obtenidos en los genotipos de yuca del Ensayo 1.

Genotipo	Variables productivas			Variables enfermedad		
	Peso total de raíces	Peso de raíces comerciales	Materia seca	No. de raíces comerciales	% Severidad	Grado
HMC-1	58.6a*	80.0a	49.7a	72a	0.1a	1a
Amarga	54.1a	65.5ab	44.9a	41ab	2.7a	1a
CM1495-5	46.3a	53.8abc	33.0a	65ab	1.7a	1a
Cumbre3	35.1a	32.2bc	24.7a	46ab	3.8a	1a
Plateada	24.6a	22.75c	14.3a	40ab	0.1a	1a
Algodona	23.3a	26.5c	20.4a	30b	0.1a	1a

* Valores seguidos por las mismas letras no difieren significativamente, de acuerdo a la prueba de rango múltiple de R-E-G-W (P<0.05)

De acuerdo al análisis de varianza, se observaron diferencias significativas (p<0.05) para las variables peso de raíces comerciales y número de raíces comerciales en los genotipos evaluados en el ensayo 1 (tabla 7). El genotipo HMC-1 presentó los valores más altos para las variables productivas evaluadas en comparación con los demás genotipos. Los genotipos plateada y algodona presentaron los valores más bajos para estas mismas variables. El grado de severidad de la enfermedad de CS fue estadísticamente similar para todas las variables con un rango entre 0.1 y 3.8.

Cuadro 10. Promedios para las variables productivas y variables de la enfermedad obtenidos en las diferentes variedades de yuca del Ensayo 2.

Genotipo	Variables productivas				Variables enfermedad	
	Peso total de raíces	Peso de raíces comerciales	Materia seca	No. de raíces comerciales	% Severidad	Grado
	kg					
CM4574-7	29.6a*	20.8a	31.7a	38a	0.1d	1c
MPER183	21.9ab	18.9a	46.5a	26ab	0.1d	1c
Roja	16.1abc	12.5ab	33.4a	18abc	4.2cd	1.1c
Mcol1505	17.2abc	11.4ab	38.8a	25abc	31.5b	2.2ab
Negra	16.9abc	11.8ab	35.9a	22abc	35.7ab	2.2ab
CM523-7	16.2abc	9.7ab	56.8a	20abc	23.7bc	1.8bc
Verde	6.7bc	2.3b	29.4a	4c	3.3cd	1.1c
NIG11	5.7c	2.0b	34.0a	5bc	53.5a	2.8a

* Valores seguidos por las mismas letras no difieren significativamente, de acuerdo a la prueba de rango múltiple de R-E-G-W (P<0.05).

De acuerdo al análisis de varianza, se observaron diferencias significativas (p<0.05) para las variables peso total de raíces, peso de raíces comerciales y número de raíces comerciales. Los genotipos CM4574-7 y MPER 183 presentaron los valores más altos para las variables evaluadas comparadas con los demás genotipos mientras que la Verde y NIG11 mostraron los valores más bajos para estas mismas variables. En cuanto al porcentaje de severidad y grado de la enfermedad se observaron diferencias altamente significativas (p<0.0001) entre genotipos. Los genotipos CM 4574-7 y MPER183 presentaron los valores más bajos (0.1) de severidad de la enfermedad. Los genotipos NIG 11, Negra y Mcol 1505 presentaron los porcentajes y grado de severidad más altos (ver figura 25 y tabla 8).

En la figura 27 se observa el porcentaje de raíces enfermas y sanas según el genotipo evaluado. En el ensayo 1 el genotipo HMC1 no presentó raíces con síntomas de la enfermedad por lo cual se considera que éste es el genotipo más resistente en comparación con los demás genotipos evaluados los cuales si tuvieron presencia de raíces enfermas. Por su parte en el ensayo 2 los genotipos que presentaron menor porcentaje de raíces con CS fueron CM4574-7 y MPER183 mientras que los demás genotipos evaluados si presentaron altos porcentajes de raíces con síntomas de la enfermedad con valores de 40 y 75% aproximadamente.

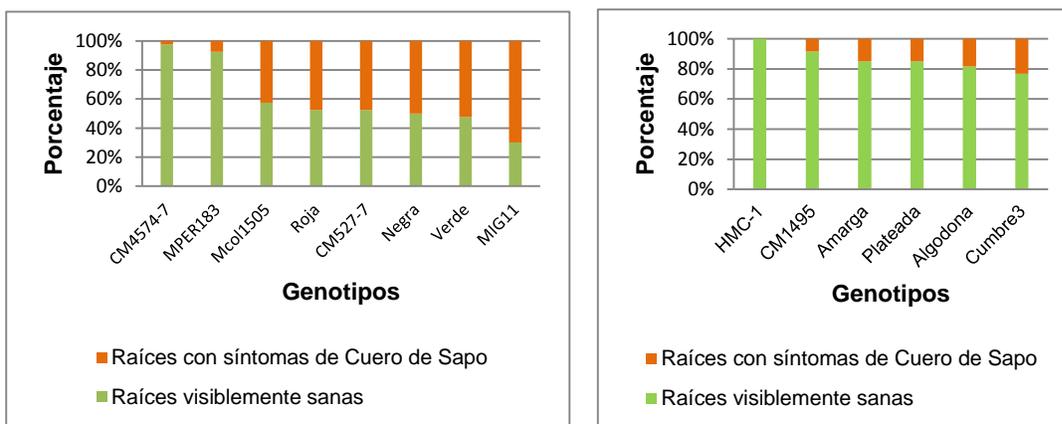


Figura 29. Distribución porcentual del número de raíces aparentemente sanas o con síntomas de CS en los genotipos de Yuca evaluados en los ensayos 1 (derecha) y 2 (izquierda).

Costa Rica: El estudio se realizó en Santa Clara de San Carlos, en la finca La Cacaotera de la empresa PCI – Rojas y Madrigal S.A, 300 Norte de la plaza de Deportes de Santa Clara de San Carlos : 10°21'45.47" Norte y 84° 31'01.80" Oeste. El estudio se realizó en el período comprendido de Marzo 2011 a Diciembre del 2014.

El área sembrada de las parcelas fué aproximadamente de 5 metros de largo * 5 metros de ancho. En el centro de la parcela se sembraron plantas de yuca libres de CS de los genotipos descritos en el cuadro No.1 y en los bordes

estacas de yuca provenientes de plantas afectadas por CS del genotipo Valencia “mejorada” (inóculo). En total se utilizaron 15 plantas de yuca como unidad experimental (Ver Figura 30).

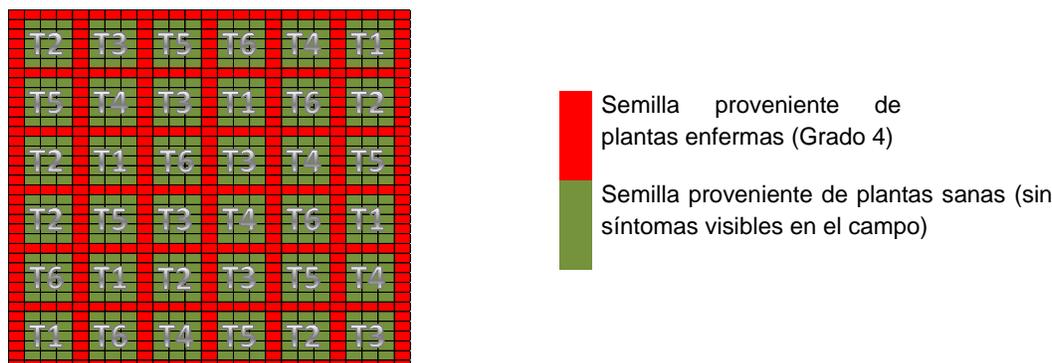


Figura 30. Parcelas ensayo Resistencia Varietal a CS de Yuca.

Tratamientos con Germoplasma de yuca para evaluación de CS: T1= T1. PER 183 (Precoz alta producción), T2= T2. MBRA 383(Precoz alta producción), T3= T3. CG-1450-4, T4= T4. CM 7640-7, T5= T5. SEÑORITA (Tardía), T6= T6. VALENCIA (Testigo local Tardía)

Manejo de insectos plaga: Durante el ensayo se manejó el control de insectos de forma racional que permitiera la presencia de las plagas / insectos pero que no pusieran en riesgo la pérdida de las parcelas por el ataque de las plagas y así asegurar la diseminación de la enfermedad

Las variables de evaluación: 1. Severidad de la enfermedad según escala 1-5 de CIAT.(Ver Figura 31). 2. Peso de raíces comerciales, 3. Peso de raíces no comerciales, 4.Número de raíces comerciales, 5. Número de raíces no comerciales, 6. Incidencia de la enfermedad

Por la diversidad de genotipos de yuca, algunos precoces otros tardíos, se unificó una sola cosecha.

Grado (% severidad)	Categoría de los Síntomas	Síntomas observados
0 (0.1)	Planta sana	Raíces engrosadas y asintomáticas. Cáscara delgada y flexible
1 (10)	Muy leves	Raíces engrosadas, con pocas fisuras o hendiduras en forma de labios y en pocas raíces, cáscara levemente opaca y poco flexible
2 (35)	Leves	Raíces engrosadas, con pocas fisuras o hendiduras en forma de labios y en muchas raíces, cáscara opaca y quebradiza
3 (65)	Moderados	Mayor número de fisuras o hendiduras en forma de labios en cualquier parte de la raíz (zona basal, intermedia, distal), con leve disminución del engrosamiento de las raíces, con cáscara opaca y quebradiza.
4 (90)	Severos	Presencia de red o panal en pocas o muchas raíces, con moderada reducción del engrosamiento de las raíces. Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza
5 (100)	Muy severos	Presencia de red o panal en muchas raíces, con severa reducción del engrosamiento de las raíces y apariencia leñosa o fibrosa. Cáscara gruesa, corchosa y quebradiza.

Figura 31. Escala de evaluación de CS. (Álvarez, E. et al, 2011)

Diseño experimental: El estudio se hizo con un diseño de Bloques completos al azar, utilizando el bloque como repetición. Cada parcela está conformada por 15 plantas sanas y los cuatro bordes por plantas enfermas.

Análisis de resultados: Los resultados de las evaluaciones de la enfermedad así como variables agronómicas de producción se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA con el programa SAS (Statistical Analysis System, ver 6.12) y se realizaron pruebas de separación de medias de Duncan y Tukey p<0.05.

RESULTADOS

Las condiciones climáticas para el desarrollo de la enfermedad del CS fueron propicias con temperaturas cálidas y abundante precipitación con el incremento de las poblaciones de varios insectos. En la Figura 3, se observa la época más seca del año que mantuvo condiciones cálidas con temperatura entre 26 y 23 °C y precipitaciones de hasta 131 mm diarios. La humedad relativa siempre superó el 80 %.

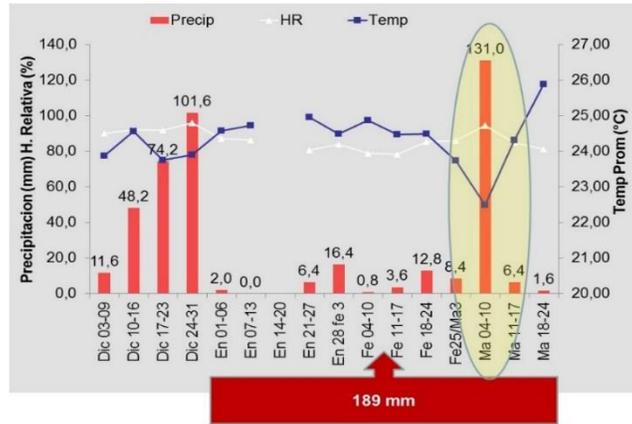


Figura 32. Datos de clima Santa Clara de San Carlos, Finca La Cacaotera. Ene – Mar 2012



Figura 33. Presencia de la enfermedad *Cercospora viscosae* (añublo pardo) en plantas de yuca.

Cuadro 11. Cosecha, variables de rendimiento, severidad e incidencia de la enfermedad de CS en plantas de yuca. INTA Mayo 2013.

GENOTIPO	Rep.	SANAS				CUERO DE SAPO	
		No. raíces	PRIMERA	No. raíces	SEGUNDA	PRIMERA	SEGUNDA
PER 183	1	35	19.45	42	11.16	0	0
TRAT 1	2	25	16.42	20	5.76	0	0
	3	32	20.45	56	12.885	0	
	4	32	19.93	36	9.82	0	0
MBRA	1	3	2.91	48	9.31	4(1)	18(0),10(3),10(4),10(5)
TRAT 2	2	22	13.405	55	12.18	3(1)	0
	3	28	16.68	99	20.45	9(1)	2(1)
	4	37	17.47	91	19.29	0	0
CG1450-4	1	10	6.14	131	32.245	3(0),7(2)	40(0), 91(1)
TRAT 3	2	0	0	86	16.02	0	67(0),19(1)
	3	12	6.74	100	13.12	6(0),4(1),2(2)	50(0),37(1),13(2)
	4	10	4.345	128	23.785	1(0),9(1)	25(0),103(1)
CM7640-3	1	32	19.17	79	17.98	13(0),19(1)	29(0),50(1)
TRAT 4	2	18	12.625	148	41.23	11(0),7(1)	109(0),36(1),3(2)
	3	2	1.005	97	19.725	1(1),1(4)	70(0),22(1),5(5)

	4	14	8.385	101	20.025	4(0),8(1),2(2)	70(0),23(1),8(2)
SEÑORITA	1	28	15.875	50	7.63	13(0),2(2),6(3),7(4)	20(0),2(2),14(3),14(4)
TRAT 5	2	4	3.005	40	8.86	2(0),2(3)	28(0),8(3),4(4)
	3	9	9.93	18	3.325	4(0),5(1)	14(0),4(1)
	4	9	6.07	34	7.275	4(0),1(1),3(2),1(3)	19(0),6(1),8(2),1(3)
VALENCIA	1	15	9.94	43	11.53	5(0),9(1),1(2)	18(0),10(1),1(2),14(5)
TRAT 6	2	11	8.78	42	14.285	6(1),3(2),2(3)	14(0),23(1),5(3)
TESTIGO	3	19	11.525	20	4.69	13(0),6(1)	13(0),7(1)
	4	8	4.38	19	3.395	8(0)	14(0),5(1)

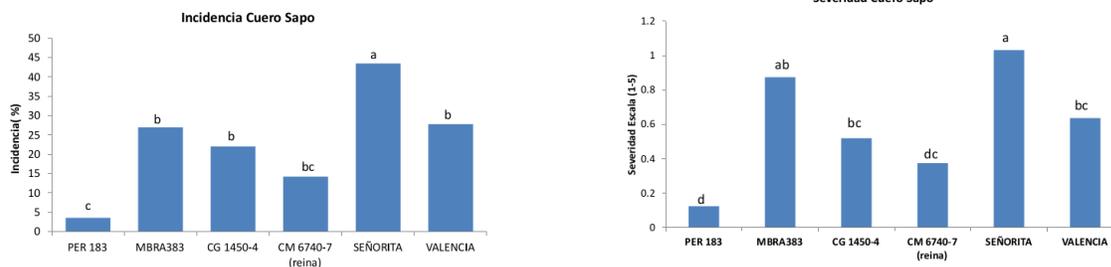


Figura 34. Incidencia y severidad de la enfermedad CS en genotipos de yuca. Mayo, 2013.

Como se observa en la figura 5 los genotipos Señorita, Valencia y MBra 383 mostraron una incidencia de la enfermedad entre 30 y 43% aunque con grado de severidad bajo, El genotipo PER 183 manifestó una alta tolerancia al CS con menos del 5% de incidencia en grado 1. El genotipo CM 6740 (Reina) y CG1450-4 mostraron una tolerancia intermedia al CS. La segunda cosecha se hizo en el mes de noviembre del 2013, cuando todas las plantas habían cumplido su madurez fisiológica para el llenado de raíces.

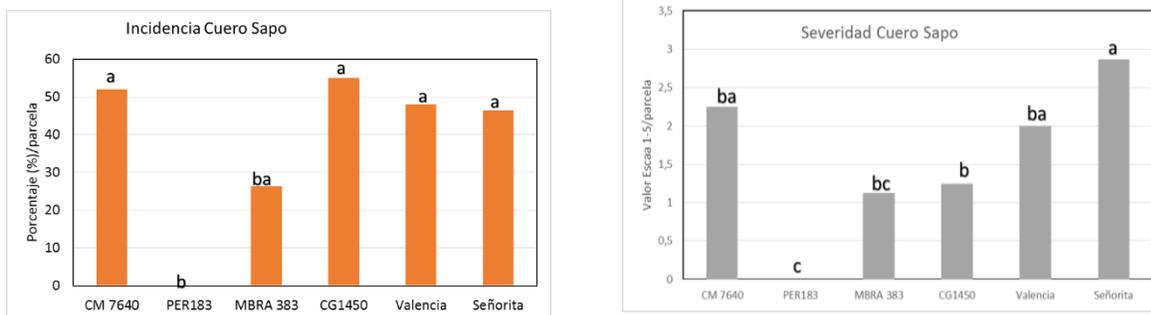


Figura 35. Incidencia y severidad de la enfermedad CS en genotipos de yuca. Dic, 2013

En la cosecha final se obtuvo un incremento significativo de la enfermedad en casi todos los genotipos evaluados a excepción de PER183 el cual ratifica su tolerancia o resistencia a la enfermedad. La incidencia se incrementó entre 55 y 27 % en los genotipos susceptibles, siendo el genotipo CG 1450 el de mayor incidencia y MBRA 383 el de menor incidencia. Respecto a la severidad de la enfermedad, el genotipo Señorita mostró una alta severidad de la enfermedad en la cual algunas parcelas obtuvieron valores de grado 4 en la escala del CIAT. El genotipo MBRA 383 no incrementó su incidencia ni severidad de la enfermedad pero además es el genotipo más precoz que le permitiría "escapar" de mayores niveles de la enfermedad.

Se sembraron estacas de yuca de las plantas cosechadas en el mismo sitio para mayor presión de inóculo. En los bordes se sembraron estacas de yuca con síntomas de CS del genotipo Valencia Mejorada. La segunda siembra se hizo en noviembre del 2013 y la cosecha en diciembre del 2014

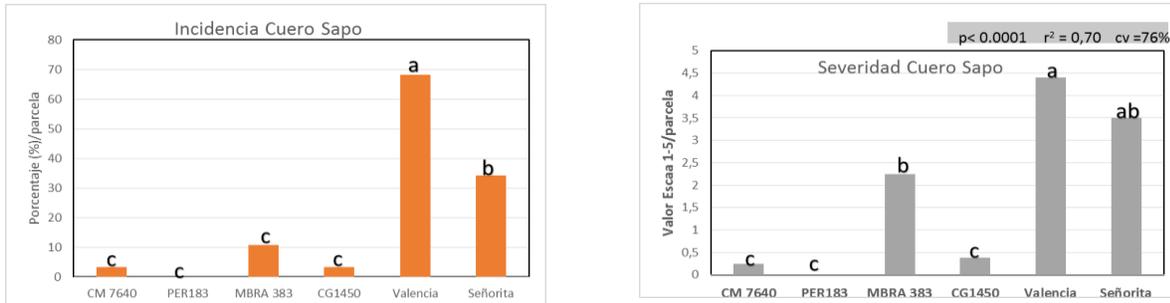


Figura 36. Incidencia y severidad de CS en genotipos de yuca. Segunda siembra. Dic 2014.



Figura 37. Síntomas de CS en las raíces de Yuca.

En la segunda siembra se incrementó significativamente la incidencia de la enfermedad hasta 100% de las raíces afectadas en algunas repeticiones. Los genotipos Valencia y Señorita presentaron valores de mayor incidencia y severidad de la enfermedad de 70% en el caso del genotipo Valencia.

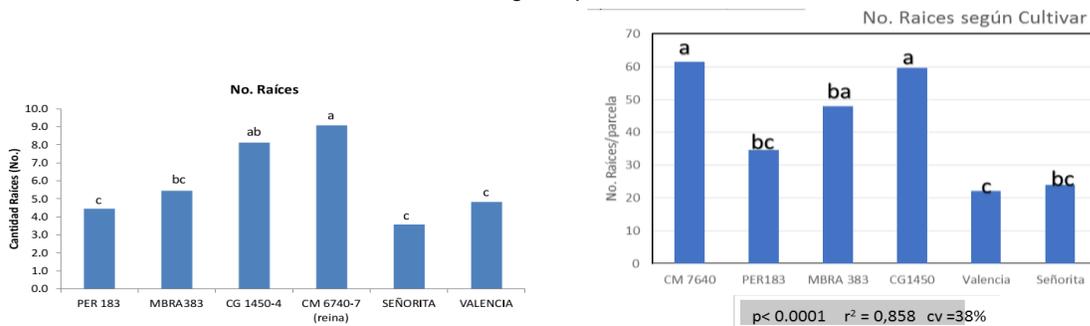


Figura 38. Número de raíces por planta en los genotipos de Yuca evaluados

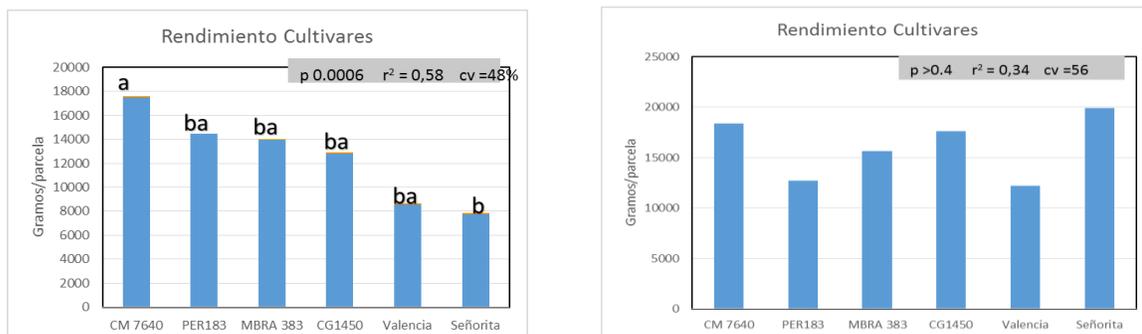


Figura 39. Rendimiento de la yuca por genotipo evaluado en el año 2013 y 2014.

En el primer ensayo se obtuvo una reducción del rendimiento pero en la segunda siembra no hubo diferencias entre tratamientos.

Conclusiones

1. Los genotipos de yuca Señorita, Valencia, MBra 383, CG 1450 y Reina (CM 6740-7) presentaron plantas sintomáticas con CS. El genotipo Señorita presentó la mayor incidencia más del 40% $p < 0.0001$ seguido por Valencia 30% y MBra383 23% $p < 0.0001$
2. El genotipo de yuca PER 183 mostró diferencias estadísticas significativas con otros genotipos de yuca evaluados. No mostró síntomas visibles superiores al grado en la escala de evaluación de CS, con una incidencia menor al 5% y una severidad de la enfermedad que no alcanzó 0.2 de la unidad según escala de evaluación de CIAT 2012.
3. La severidad de la enfermedad CS fué superior estadísticamente $p < 0.0001$ en el genotipo Señorita que superó Valencia, CG1450-4, Reina y Per 183. No mostró diferencia respecto a MBra 383 que también presentó altos niveles de severidad de la enfermedad en el primer ciclo de cosecha.
4. El rendimiento de los genotipos de yuca evaluados fue similar, únicamente el cultivar Señorita mostró un rendimiento menor estadísticamente $p < 0.001$
5. El número de raíces del genotipo Reina y CG 1450-4 fué superior estadísticamente $p = 0.0001$ comparado con los otros genotipos con excepción de MBra 383. En estos genotipos se logró hasta 9 raíces por planta en etapa de precosecha.
6. La incidencia y severidad de la enfermedad se manifestó en el primer ciclo de cosecha de genotipos de yuca provenientes de cultivo de tejidos y sometidos a presión de inóculo.
7. La incidencia y severidad de la enfermedad se incrementó en la segunda siembra de estacas provenientes del cultivo anterior. La concentración del fitoplasma en la planta aumentó de un ciclo o año de cultivo al otro.
8. A nivel de rendimiento no se observaron diferencias entre los tratamientos en la segunda siembra.

Paraguay:

El experimento se hizo en el Campo Experimental de Choré, ubicado en Choré, Departamento de San Pedro. El periodo experimental tuvo una duración de 14 meses.

El diseño experimental utilizado fué de bloques completos al azar con 6 tratamientos y 6 repeticiones; los tratamientos consistieron en los genotipos que se describen en el cuadro 14. Como inóculo se utilizó el genotipo **Canó** con síntomas de la enfermedad.

Genotipos utilizados como tratamientos en el experimento. Choré, Paraguay. 2015. T1= Pomberí (Testigo), T2= Canario, T3= Porotue, T4= Rama Ava, T5= Caranda'y, T6= Matambre

Los valores obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza ANOVA (Test F 5%) y la comparación de medias a través de Test de Tukey al 5%. Utilizando el Paquete de Diseños Experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nueva León México (FAUANL) 1994.

A. Número de raíces comerciales de yuca (*Manihot esculenta*)

En los genotipos Matambre y Pomberí (testigo) no se observaron diferencias estadísticas significativas de acuerdo a los resultados de las medias obtenidas los cuales se presentan en el **Gráfico 7**.

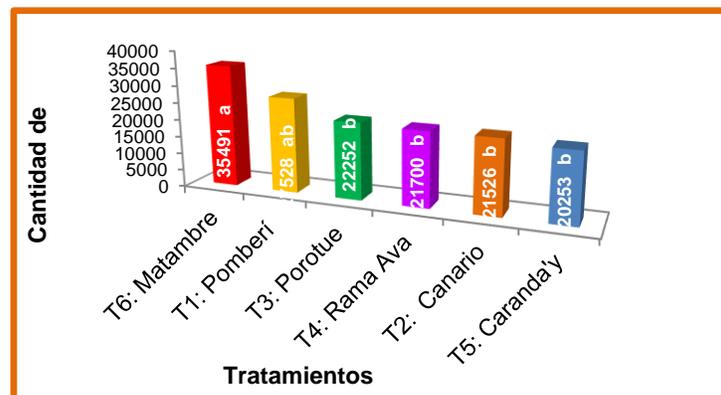


Gráfico 7. Promedio del número de raíces comerciales. Choré – Paraguay. 2015.

Se observaron diferencias significativas en el número de raíces comerciales entre los genotipos Matambre comparado con Porotue, Rama Ava, Canario y Caranda'y, siendo la diferencia de 13.239, 13.791, 13.965 y 15.238 respectivamente.

B. Número de raíces no comerciales de yuca (*Manihot esculenta*).

El mayor número de raíces comerciales se obtuvo en el genotipo Caranda'y, en los otros genotipos fue inferior, la diferencia entre Caranda'y y Matambre fue de 11.669 siendo no significativa estadísticamente.

Al comparar el genotipo Caranda'y con Porotue, Canario, Rama Ava y Pomberí, los resultados fueron estadísticamente significativos siendo las diferencias 14.808, 17.996, 18.269 y 20.005 respectivamente. Los resultados de los promedios se observan en el gráfico 8 y el análisis de varianza se presenta en el anexo 2.

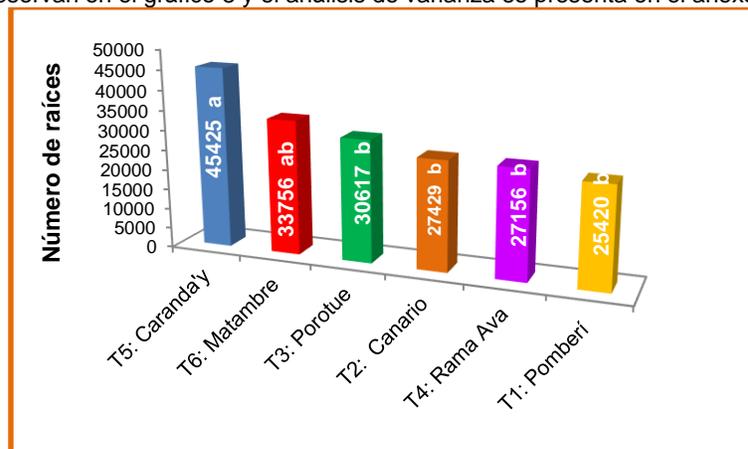


Gráfico 8. Promedios del número de raíces no comerciales. Choré – Paraguay. 2015

C. Peso de raíz comercial de yuca (*Manihot esculenta*)

Los resultados de los promedios obtenidos presentados en el gráfico 9 muestran diferencias significativas entre los genotipos Matambre con relación a Pomberí, Rama Ava, Porotue, Canario y Caranda'y, siendo la diferencia en rendimiento de Kg/ha de 4.514, 5437, 5.567, 8.034, 9.958 respectivamente.

Entre los genotipos Pomberí, Rama Ava y Porotue las diferencias fueron mínimas y no fueron significativas estadísticamente, así mismo entre Rama Ava y Porotue y finalmente Canario y Caranda'y.

El análisis de varianza ANOVA (Test F 5%) se presenta en el anexo 3.

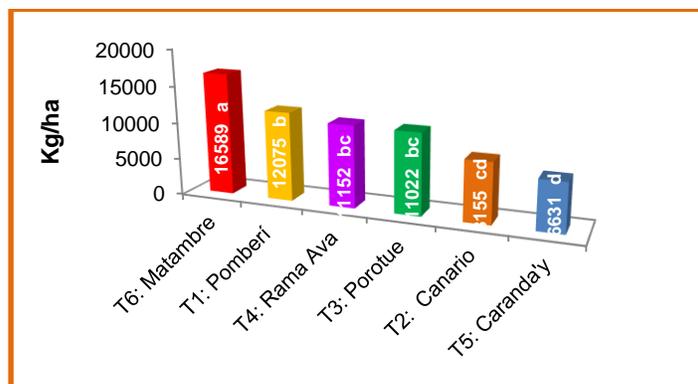


Gráfico 9. Promedios del peso de raíces comerciales. Choré – Paraguay. 2015.

D. Peso de raíz no comercial de yuca (*Manihot esculenta*)

En el gráfico 4 se presentan las promedios del peso de raíz comercial correspondientes a cada tratamiento y el análisis de varianza ANOVA (Test F 5%) se presenta en el anexo 4.

Se observaron diferencias significativas entre los genotipos Caranda'y y Pomberí, luego con Canario y finalmente con Rama Ava, siendo el peso de diferenciación entre las mismas 1.597 Kg/ha para la primera, 1752 Kg/ha para la segunda y 1.885 Kg/ha para la última.

No se observaron diferencias significativas entre los genotipos Caranda'y, Matambre y Porotue; ni entre Matambre, Porotue, Pomerí, Canario y Rama Ava.

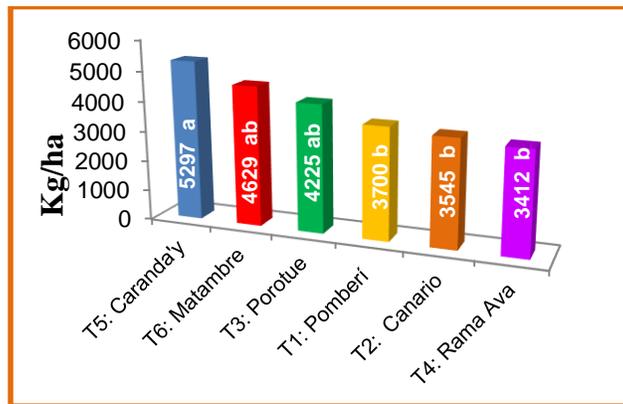


Gráfico 10. Promedios del peso de raíces no comerciales. Choré – Paraguay. 2015.

E. Peso en agua de la raíz de yuca (*Manihot esculenta*)

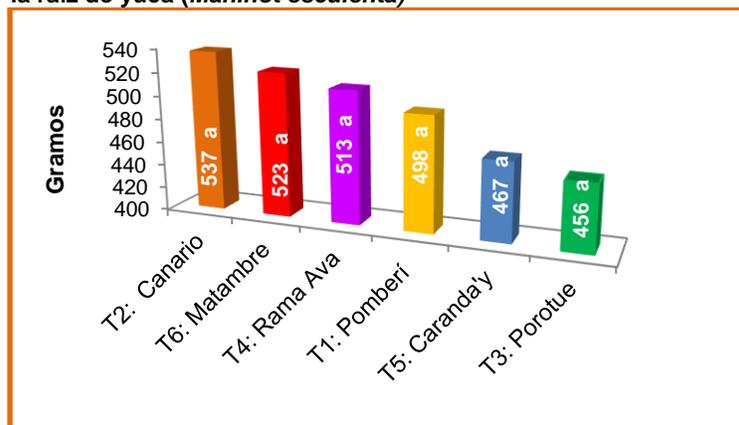


Gráfico 11. Promedios del peso en agua de la raíz. Choré – Paraguay. 2015.-

Con los promedios obtenidos y el resultado del Test de Tukey al 5% (Gráfico 5), no se observaron diferencias significativas para esta variable.

El análisis de varianza ANOVA (Test F al 5%) se presenta en el anexo 5.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente: El genotipo Matambre produjo mayor número de raíces comerciales y mayor rendimiento. En cuanto al número y peso de raíces no comerciales el genotipo Caranda'y fue la de mejor producción. Con relación al peso en agua el genotipo Canario fue el de mejor producción.

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos se recomienda en trabajos futuros, y teniendo en cuenta que estos genotipos a excepción del Pomerí, son de ciclo largo (24 meses), prolongar el tiempo de cosecha para que puedan expresar su potencial genético.

Cuadro principales hallazgos

Componente	Logros	Resultado	País
1. Analizar el impacto potencial actual y futuro del cambio climático sobre la enfermedad del CS y los vectores que la transmiten.	Mapas de distribución actual, futuro 2020, 2050	9 mapas	Colombia (3) Costa Rica (3) Paraguay (3)
	Potenciales vectores: Scaphytopius marginelineatus, Macunola ventralis, Typholocy binae y Hortensia similis	1 especie	Colombia
		3 especies 1 especie	Costa Rica Paraguay
2. Implementar un sistema de producción de semilla vegetativa certificada mediante el uso de un sistema in vitro y de cámaras térmicas	Grupo 16SrIII Grupo 16SrIII, 16SrI (12) Grupo 16SrIII, 16SrI (15)	81 Secuencias en GenBank	Colombia (18) Costa Rica (16) Paraguay (47)
	Investigadores capacitados en sintomatología y detección	150 40 30	Colombia Costa Rica Paraguay
	Plantas producidas por termoterapia.	37500 3020	Colombia Costa Rica Paraguay
	Agricultores capacitados en técnicas de multiplicación rápida	300 100 367	Colombia Costa Rica Paraguay
	Cámaras térmicas implementadas	5 cámaras térmicas	Colombia (3) Costa Rica (1) Paraguay (1)
	Plantas In vitro producidas por técnica de yemas apicales	12000 plantas de los genotipos: MPER-183, CM7640-7, CG1450-4, MBRA-383, CM7514-8, SM805-15, Señorita y Valencia	Colombia Costa Rica Paraguay
	Técnica de qPCR implementada	CIAT, INTA, TEC, IPTA	Colombia Costa Rica Paraguay
3. Evaluar el efecto de Inductores de resistencia para el control de CS	Inductores de resistencia identificados	Kendal KCL Cuneb Forte	Colombia Costa Rica Paraguay
4. Seleccionar genotipos de yuca tolerantes a CS	Genotipos resistentes identificados	CM4574-7, MPER-183 y HMC-1 MPER-183 y Reina Mesai	Colombia Costa Rica Paraguay

Discusión de resultados

Componente 1. Analizar el impacto potencial actual y futuro del cambio climático sobre la enfermedad del CS y los vectores que la transmiten, y a la vez, plantear un estudio epidemiológico de la enfermedad en Colombia, Costa Rica y Paraguay.

No hay una correlación positiva entre variables climáticas de aquellas zonas donde se presenta la enfermedad con las zonas donde la enfermedad nunca se ha reportado, lo que significa que factores climáticos influyen sobre la dispersión de la enfermedad del CS. En los modelos de distribución futura de la enfermedad 2020 y 2050 (Figuras 1 y 2) se observa que la enfermedad tiende a incrementar las áreas afectadas a causa del cambio climático posiblemente por el incremento de nuevos nichos para el o los insectos vectores de la enfermedad, lo que permite a los insectos colonizar nuevas regiones (Boudon & Maixner. 2007).

Se amplificaron fragmentos de peso molecular de 900pb utilizando cebadores específicos para la detección del fitoplasma (16SrIII R16(III)F2/R16(III)R1) en los insectos *Scaphytopius marginelineatus*, *Macunola ventralis*, *Typholocy binae* y *Hortensia similis*, identificados como insectos potenciales a transmitir la enfermedad colectados en campos de yuca con presencia de síntomas de CS en raíces. El género *Scaphytopius* se encuentra reportado como vector de

fitoplasmas del grupo 16SrIII (Marques *et al.*, 2012) a diferencia de los otros géneros de insectos descritos; Se reportan vectores para los grupos de fitoplasmas 16SrA y 16SrB (Weintraub & Beanland., 2006).

Al hacer las extracciones de ADN de tejido vegetal de raíces de yuca con síntomas típicos de CS en Colombia, Costa Rica, y Paraguay se determinó 100% de homología con el fitoplasma 16SrIII-L reportado por Alvarez *et al.*, 2009. Se generaron 54 accesiones de los tres países lo cual confirma la asociación del fitoplasma 16SrIII con la enfermedad del CS en Colombia, Costa Rica y Paraguay. Por otro lado Oliveira *et al.*, 2014 reportó el fitoplasma 16SrIII-L asociado con la enfermedad del CS en Brasil, resultado que confirma lo reportado en el proyecto.

Con el fin de mejorar la sensibilidad de la técnica de detección mediante PCR anidado se diseñó una metodología de PCR en Tiempo Real utilizando sondas TaqMan[®]. La sensibilidad de la técnica de qPCR comparada con la PCR anidada fue 1000 veces más sensible evitando los falsos negativos (Baric *et al.*, 2006).

Para cuantificar la cantidad del microorganismo en el tejido enfermo se utilizó la cuantificación relativa, para lo cual se prepararon estándares externos, utilizando como unidad de medida el número de copias del plásmido (Tatineni *et al.*, 2008) o concentración del gen sintético en femtomoles. La utilización de un gen sintético facilita la elaboración de la curva estándar y la cuantificación al evitar el proceso de clonación.

La técnica de PCR en Tiempo Real se implementó en Colombia, Costa Rica y Paraguay, técnica que va a permitir la certificación de material de siembra de yuca y de bancos de germoplasma de cada país; convirtiéndose en la principal estrategia para el control de CS en los tres países.

Componente 2: Implementar un sistema de producción de semilla vegetativa certificada, mediante el uso de un sistema *in vitro* y de cámaras térmicas.

El método de cámara térmica para limpieza de fitoplasma en semilla de yuca tiene su fundamento en lo reportado por Sforza *et al.*, (2014) y European and Mediterranean Plant Protection Organization (2012) quienes reportan tratamientos efectivos con termoterapia utilizando 50C por 45 minutos para el control de las enfermedades conocidas como Elm Yellows (amarillamiento del olmo) y Flavescence dorée (Flavescencia dorada) las cuales afectan olmos y uva respectivamente. La cámara térmica entre las 10 am y 1 pm puede alcanzar una temperatura de 55C y teniendo en cuenta que el proceso de propagación masiva dura 1 mes, ninguna de las plantas expresa síntomas en campo de CS.

El método de propagación masiva implementado en la cámara térmica fue una adaptación de lo reportado por Cock (1997) quien describe la siembra de microestacas de dos nudos en condiciones de altas temperaturas y humedad, luego los brotes generados se cortan y se ponen a enraizar en frascos con agua. El proyecto permitió modificar esta metodología haciéndola mucho más eficiente y fácil de utilizar al sustituir las miniestacas y eliminar el enraizamiento en frascos con agua, proceso que es muy dispendioso. Con la cámara térmica se pueden producir en 16 unidades productivas 592 plantas cada dos semanas, produciéndose al año hasta 11.500 plantas.

Componente 3: Evaluar el efecto de micronutrientes, fertilizantes y extractos vegetales sobre el comportamiento de la enfermedad del CS en variedades locales.

Utilizando una dosis de Kendal de 2.400 ml /Ha es posible incrementar el rendimiento del cultivo de yuca en un 20% y disminuir la incidencia del CS en un 10%, con una frecuencia de aplicación de 20 días. Romanazzi *et al.*, (2009) reporta para la enfermedad de Bois Noir en el cultivo de uva un porcentaje de recuperación entre 51% y 71% utilizando el inductor Kendal con una frecuencia de aplicación de 10 días y una dosis de 2.5-4L/Ha.

El KCl es el elemento que la planta de yuca extrae más que otro elemento; un buen cultivo extrae 100 kg/Ha o más. Cuando el potasio disminuye la calidad de la yuca se afecta: el contenido de materia seca y de almidón de las raíces disminuye y el cianuro aumenta. En Costa Rica se observó un incremento del rendimiento en los tratamientos con KCl, lo cual ratifica que éste es un elemento esencial para la producción de yuca (Cock., 1997).

Por otro lado el KCl podría llegar a tener un efecto bactericida en el suelo al acidificar el suelo disminuyendo su pH evitando así el desarrollo de las bacterias (Sylvia *et al.*, 2005).

Componente 4: Seleccionar genotipos de yuca resistentes o tolerantes al CS para las zonas de estudio.

En Costa Rica el genotipo de importancia económica "Valencia" presenta una alta susceptibilidad al CS encontrándose cultivos con un 100% de incidencia. Teniendo en cuenta que el interés de Costa Rica es la exportación de yuca, el INTA identificó los genotipos Señorita, MBra 383, CG 1450-4, Reina (CM 6740-7), PER 183 como promisorios para reemplazar el genotipo "Valencia". Sin embargo las evaluaciones realizadas en este proyecto demostraron que los

genotipos VALENCIA, MBra 383 evaluados son susceptibles al CS, a excepción del genotipo PER 183 que en dos años de evaluación no mostró síntomas de la enfermedad.

En Colombia, el genotipo PER 183 mostró resistencia a CS, los genotipos HMC-1, CM 4574-7, y el genotipo local Cumbre 3 mostraron tolerancia a la enfermedad. Dichos genotipos son promisorios para reemplazar el genotipo susceptible MBRA 383 de uso común en la zona de estudio.

Conclusiones

Componente 1.

- No se estableció una correlación positiva entre variables climáticas de zonas donde se presenta la enfermedad con las zonas donde la enfermedad nunca se ha reportado, lo que significa que factores climáticos influyen sobre la dispersión de la enfermedad del CS.
- En los modelos de distribución futura de la enfermedad 2020 y 2050 para los tres países se observa que la enfermedad tiende a incrementar las áreas afectadas a causa del cambio climático posiblemente por el incremento de nuevos nichos para el o los insectos vectores de la enfermedad, lo que permite a los insectos colonizar nuevas regiones.
- La técnica molecular qPCR es muy específica y reproducible para detectar el agente asociado a la enfermedad CS y a través de ésta se logró determinar la presencia del fitoplasma 16SrIII-L en raíces con síntomas de CS en Colombia, Costa Rica y Paraguay, lo cual es importante ya que la identificación del microorganismo es el punto de partida para la implementación de estrategias de manejo y certificación de material de siembra.

Colombia:

- El insecto *Scaphytopius marginelineatus* se identificó como vector potencial de CS, se pudo establecer su cría masiva en yuca y en frijol.
- El insecto *Scaphytopius marginelineatus* es un vector potencial del fitoplasma 16SrIII-L y debe ser tenido en cuenta en los programas de manejo de la enfermedad, especialmente en los meses de julio a septiembre, cuando sus poblaciones se incrementan en campo.
- El insecto *Scaphytopius marginelineatus* adquiere el fitoplasma 16SrIII después de un período de alimentación de 96 horas en plantas de yuca infectadas con el patógeno.

Costa Rica:

- En Costa Rica se identificaron como vectores potenciales del fitoplasma 16SrIII-L los insectos *Macunola ventralis*, *Typholocy binae* y *Hortensia similis*.

Paraguay:

- En Paraguay se identificó como vector potencial del fitoplasma 16SrIII-L insectos de la familia cicadellidae

Componente 2: Implementar un sistema de producción de semilla vegetativa certificada, mediante el uso de un sistema *in vitro* y de cámaras térmicas.

El proyecto permitió modificar esta metodología haciéndola mucho más eficiente y fácil de utilizar al sustituir las miniestacas y eliminar el enraizamiento en frascos con agua, proceso que es muy dispendioso. Con la cámara térmica se pueden obtener en 16 unidades productivas 592 plantas cada dos semanas, produciéndose al año hasta 11.500 plantas.

Componente 3. Evaluar el efecto de micronutrientes, fertilizantes y extractos vegetales sobre el comportamiento de la enfermedad del CS en variedades locales

Costa Rica: El tratamiento KCL presenta mayor efecto como fertilizante aumentando la producción.

- Conforme se incrementa la enfermedad en la planta, se reduce la producción, todos los tratamientos superaron al testigo en producción pero la enfermedad se ve enmascarada.

Paraguay

- Los inductores de resistencia evaluados comparados con el Testigo no mostraron diferencias entre sí la incidencia, número y rendimiento de raíces comerciales y no comerciales.
- Los inductores de resistencia Kendall y Cuneb Forte fueron los que mostraron un resultado superior relacionado al peso de raíz en agua, pudiendo ser utilizados dependiendo de la disponibilidad del producto en el mercado local

Colombia

- Utilizando una dosis de Kendal de 2.400 ml /Ha es posible incrementar el rendimiento del cultivo de yuca en un 20% y disminuir la incidencia del CS en un 10%, utilizando una frecuencia de aplicación de 20 días.

Componente 4. Seleccionar genotipos de yuca resistentes o tolerantes al CS para las zonas de estudio.**Colombia**

- En Colombia el genotipo PER 183 mostró resistencia a CS, los genotipos HMC-1, CM 4574-7, y el genotipo local Cumbre 3 mostraron tolerancia a la enfermedad. Estos genotipos son promisorios para remplazar el genotipo MBRA 383 de uso común en la zona de estudio.

Costa Rica

- Los genotipos de yuca Señorita, Valencia, MBra 383, CG 1450 y Reina (CM 6740-7) presentaron plantas sintomáticas con CS. El genotipo Señorita presentó la mayor incidencia más del 40% $p < 0.0001$ seguido por Valencia 30% y MBra383 23% $p < 0.0001$
- El genotipo de yuca PER 183 se diferenció estadísticamente de todos los demás materiales sin manifestación de síntomas visibles superiores a la escala No. 1 de evaluación de CS con una incidencia menor al 5% y una severidad de la enfermedad que no alcanzó 0.2 de la unidad según escala de evaluación de CIAT 2012.
- La severidad de la enfermedad CS se manifestó superior estadísticamente $p < 0.0001$ en el genotipo Señorita que superó Valencia, CG1450-4, Reina y Per 183. Sin diferenciarse respecto a MBra 383 que también presentó altos niveles de severidad de la enfermedad en la primera época de cosecha.

Recomendaciones

- Confirmar el rol que cumple el insecto en la diseminación de la enfermedad.
- Desarrollar estrategias de control del insecto vector de la enfermedad con el fin de detener la diseminación de la enfermedad a causa del cambio climático.
- Implementar métodos moleculares de diagnóstico en campo del fitoplasma 16SrIII-L de fácil manejo, bajo costo y alta sensibilidad.
- Transferir la tecnología de cámaras térmicas a un mayor número de países.
- Transferir las tecnologías desarrolladas: multiplicación masiva de semilla limpia en cámaras térmicas, genotipos resistentes, uso de inductores de resistencia a agricultores afectados por CS en otros países de centroamérica.

Difusión y publicaciones

Cartillas

- Alvarez, E.; Pardo, J.M.; Mejia, J.F.; Oliveria, S.A.S.; Zacher, M.; Gomez, Y. 2015. Manejo del 'Cuero de sapo' enfermedad limitante de la yuca. Cartilla
- Gomez, Y.; Torres, S.; Alvarez, E.; Pardo, J.M.; Aguilar, E.; Solorzano, J.A. 2014. Manejo de semilla de la enfermedad de Cuero de sapo en el cultivo de yuca. Manual de instalación, funcionamiento y uso de la cámara térmica para la producción de semilla de yuca libre de patógenos asociados a la enfermedad de Cuero de sapo. 24 p CIAT, Cali Colombia.

Folleto

- Alvarez, E.; Pardo, J.M.; Zacher, M.; Cardozo, L.; Torres, A. 2014 "Cuero de Sapo" Enfermedad de la mandioca en Paraguay. Folleto

Blogs

- Cámara de termoterapia, marcando la diferencia en la multiplicación de semilla de yuca y plátano - See more at: <http://ciatblogs.cgiar.org/agrobiodiversidad/camara-de-termoterapia-marcando-la-diferencia-en-la-multiplificacion-de-semilla-de-yuca-y-platano-2/#sthash.pwopPiOw.dpuf>
- Novedoso sistema portátil para la detección de patógenos en campo - See more at: <http://ciatblogs.cgiar.org/agrobiodiversidad/novedoso-sistema-portatil-para-la-deteccion-de-patogenos-en-campo/#sthash.xqbF3PW9.dpuf>
- A portable field pathogen detection system for disease-free planting material - See more at: <http://ciatblogs.cgiar.org/agbio/a-portable-field-pathogen-detection-system-for-disease-free-planting-material/#sthash.q7W0gEit.dpuf>

Posters

- Pardo, J.M.; Alvarez, E.; Moreno, L.; Dufour, D. 2014. The metabolism of carbohydrates in roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) infected with frog skin disease. [Poster]. APS-CPS Joint Meeting in Minneapolis, MN, August 9-13, 2014. 1p
- Alvarez, E.; Pardo, J.M. 2014. First report of hypovirulence between a reovirus and phytoplasma 16SrIII-L associated with frog skin disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). [Poster]. APS-CPS Joint Meeting in Minneapolis, MN, August 9-13, 2014. 1p

Abstracts

- Pardo, J.M.; Alvarez, E.; Moreno, L.; Dufour, D. 2014. The metabolism of carbohydrates in roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) infected with frog skin disease. Phytopathology 104 (Suppl. 3)S3.7
- Alvarez, E.; Pardo, J.M. 2014. First report of hypovirulence between a reovirus and phytoplasma 16SrIII-L associated with frog skin disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Phytopathology 104 (Suppl. 3)S3.7
- Ceballos, G.; Pardo, J.M.; Álvarez, E. 2014. Escalamiento tecnológico en la producción masiva y sostenible de semilla limpia de yuca y plátano para la agricultura familiar. En: Memorias III Convención Internacional AGRODESARROLLO 2014, 21 -23 Octubre, Varadero, Cuba. p. 67-73
- Alvarez, E.; Pardo, J.M.; Contaldo, N.; Patrineri, S.; Bertaccini, A.; Mejia, J.F. 2014. Phytoplasma infection in Cassava plant with frog skin disease from Costa Rica and Paraguay. In: 20th Congress of the International Organization for Mycoplasma (IOM2014), June 01-06, Blumenau, Brazil
- Pardo, J.M.; Truke, M.J.; Cardozo, L.; Varela, I.; Alvarez, E. 2014. A real-time PCR assay to detect and quantify 16SrIII-L and 16SrI phytoplasmas associated with cassava frog skin disease in Costa Rica and Paraguay. Phytopathology 105(Suppl. 1): S1.3
- Alvarez, E., Pardo, J.M., Truke, M.J. 2014. A portable field pathogen-detection system for disease-free planting materials. Phytopathology 105(Suppl. 1): S1.5
- Betancourth, C. A., Pardo, J.M., Truke, M.J. Muñoz, J.E. Alvarez, E. 2014 In vitro isolation of a phytoplasma associates with frog skin disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Phytopathology 105(Suppl. 1): S1.6

Protocolo

- Alvarez, E.; Pardo, J.M. 2013. I International Course: Cassava Witches'-Broom Disease Diagnostic methods and Alternatives for the integrated management of the disease. Protocols

Tesis

- Pardo, J.M. 2013. Desarrollo de una metodología de PCR en Tiempo Real para detección y cuantificación de fitoplasma 16SrIII-L y reovirus CFSV asociados con la enfermedad del Cuero de Sapo en yuca. Tesis (Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en protección de Cultivos) Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia. 144p
- Mejia, J.F. 2014. Identification and genetic diversity in Phytoplasmas associated with diseases of cassava and other agronomic relevant crops In south-east asia and latin America. Tesis (Doctorado En Ciencias Agrícolas). Alma Mater Studiorum - Università di Bologna. Bologna, Italia. 139p.
- Betancourth, C. 2015. Estudio del aislamiento y patogenicidad y potenciales vectores de un fitoplasma asociado a la enfermedad de Cuero de sapo en yuca. Tesis (Doctorado en Ciencias Agrarias con énfasis en protección de Cultivos) Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.

Artículos

- Pardo, J.M.; Álvarez, E. 2015. Hypovirulence between a reovirus and phytoplasma 16SrIII-L associated with frogskin disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)
- Álvarez, E.; Pardo, J. M.; Truke, M. J. 2015. Using LAMP Amplification Technology to Detect a Phytoplasma Associated with Cassava Frogskin Disease
- Betancourth, C.; Pardo, J.M.; Álvarez, E. 2015 Aislamiento biológico y pruebas de patogenicidad con phytoplasma 16srIII-L asociado a cuero de sapo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

Congresos Internacionales

- VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología REDBIO-Argentina 2013" 18-22 de noviembre de 2013, Mar del Plata
- 59 Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA) Managua, Nicaragua. 28 abril – 3 Mayo, 2014
- 20th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM) 1-6 June, 2014, Blumenau, Santa Catarina, Brazil
- 2014 Caribbean Division Meeting, US Virgin Islands, July 6-10, 2014 joint with the Caribbean Food Crop Society (CFCS)
- APS-CPS Joint Meeting in Minneapolis, MN, August 9-13, 2014.
- 2014 APS Northeastern Division Meeting, Portsmouth, New Hampshire October 29-31, 2014

Bibliografía

- Alvarez, E.; Mejía, J.F.; Loke, J.; Llano, G. 2006. Detection and characterization of a Phytoplasma associated with cassava frogskin disease. *Fitopatología Colombiana* 29(2):69-76
- Álvarez, E.; Llano, G.A.; Rodríguez, S.M.; Hernández, M.L.; 2007. Efecto de inductores de resistencia sobre pudrición de cogollo de palma de aceite en los Llanos Orientales de Colombia. *Fitopatología Colombiana*. 30(1):15-18
- Álvarez, E.; Castillo, F.; Llano, G.A.; Gómez, E.A. 2008. Utilización de fosfitos de potasio en el control de *Peronospora sparsa*, causante del mildew velloso de rosa. *Fitopatología Colombiana*. 31(2): 49-52.
- Álvarez, E.; Mejía, J.F.; Llano, G.; Loke, J.; Calari, A.; Duduk, B.; Bertaccini, A. 2009. Detection and molecular characterization of phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant Disease* 93:1139-1145.
- Álvarez, E.; Mejía, J.F.; Pardo, J.M. 2010. Development of a Real-time PCR assay, to detect and quantify a 16SrIII-L Phytoplasma associated with cassava frogskin disease (CFSD). *Phytopathology* 100:S5.
- Baric, S.; Kerschbamer, C.; Dalla, J., 2006. TaqMan Real-time PCR versus Four Conventional PCR Assays for Detection of Apple Proliferation Phytoplasma. *P. Mol Biol Rep* 24: 169-184
- BBSRC (the Biotechnology and Biological Sciences Research Council). 2008, <http://www.bbsrc.ac.uk/media/releases/2008/080806-aphids-climate-change.aspx>.
- Bergamin, A.; Hau, B.; Amorim, I.; De Jesús, W. 2004. Análisis espacial de epidemias. En: *Epidemiología aplicada al manejo de las plantas*. Pp. 202-204.
- Bertaccini, A. 2008. II International Phytoplasma Workshop, International Scientific Seminar on Plant Health, Havana Convention Palace, Cuba.
- Boudon-Padieu, E.; Maixner, M. 2007. Potential effects of climate change on distribution and activity of insect vectors of grapevine pathogens. *Global warming, which potential impacts on the vineyards?:* 1-8.
- Busby, J.R. 1991. BIOCLIM: A bioclimatic analysis and prediction system. *Plant Protection Quarterly*. 6, 8-9.
- Calvert, L.A. 1994. The safe movement of cassava germplasm. En *First Meeting of the internacional Network*. For Cassava Genetic Resource: Report of the First meeting of the international Network for Cassava Genetic Resources, Organizado por CIAT, IITA e IBPGR en el CIAT, Cali, Colombia.
- Calvert, L.; Cuervo, M. 2002. Cuero de Sapo: yuca en el tercer milenio. *Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. Eds: B. Ospina y H. Ceballos. p. 264-268.
- Cervera, M.; Cautín, R.; Jeria, G. 2007. Evaluación del fosfito cálcico, potásico y magnésico en el control de *Phytophthora cinnamomi* en paltos (*Persea americana* Mill) cv. hass plantados en contenedor *Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007*. Viña Del Mar, Chile. 12 – 16 Nov. 2007. On line: <http://www.avocadosource.com/> 63
- CIAT. 2002. La yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali-Colombia, Publicación CIAT; No. 327.586 P.
- CIAT. 2004. Integrated Pest and Disease Management in Major Agroecosystems. Annual Report. Cassava and Tropical Fruit Pathology, Activity 8, pp. 242-246. CIAT. 2005. Integrated Pest and Disease Management in Major Agroecosystems. Annual Report. Cassava and Tropical Fruit Pathology.
- Chaparro-Martínez, E. I.; Trujillo-Pinto, G. 2009. First Report of Frog Skin Disease in Cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela. *Disease Notes*.
- Coakley, S. M.; Scherm, H.; Chakraborty, S. 1999. Climate change and plant disease management. *Annual Review Phytopathology* 37: 399-426.
- Collins, W.D.; Bitz, C.M.; Blackmon, M.L.; Bonan, G.B.; Bretherton, C.S; Carton, J.A.; Chang, P.; Doney, S.; Hack, J.; Henderson, T.B; Kiehl, J.H. ; Large, W.G.; Mckenna, D.S.; Santer, B.D.; Smith, R.D. 2005. The Community Climate System Model (CCSM). *Journal of Climate*, special issue. 19: 2122-2143
- Cock, J.H. 1989. LA YUCA, Nuevo Potencial para un Cultivo Tradicional. ISBN 84-89206-82-1.
- Cuervo, M.; Villareal, N.; Lozano, I.; Arroyave, J.; Calvert, A.L. 2004. Identificación del grupo reoviridae afectando yuca y su asociación con la enfermedad de cuero de sapo. En *Memorias del XXV congreso de Ascolfi*, Agosto 11-13 de 2004, CIAT Palmira, 27 P.

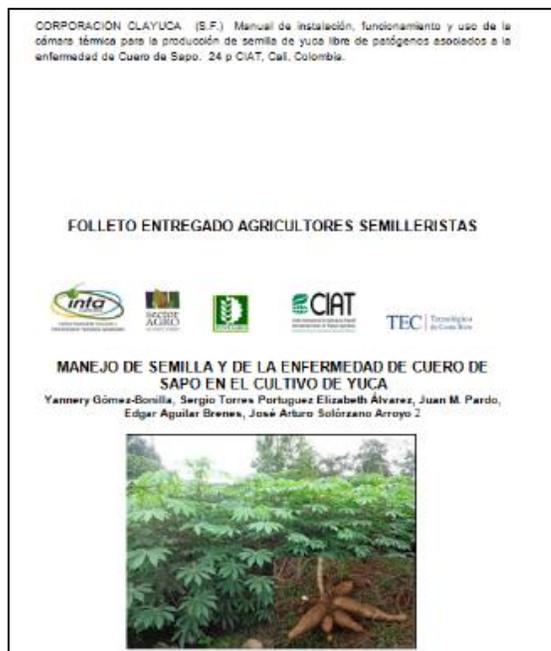
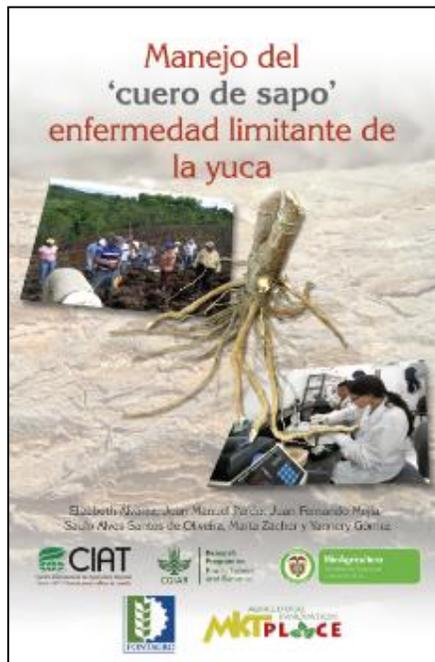
- Davis, A. J.; Sag, M.; Show, A.J.; Grant, B.R. 1994. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* to phosphonate. *Plant Pathology* 43: 200-205.
- Delworth, T.L. 2004. GFDL's CM2 global coupled climate models –part 1 Formulation and simulation characteristics. *Journal of Climate*.
- Diansky, N.A.; Zeleny, V.B. 2002. Simulation of present-day climate with a coupled Atmosphere-ocean general circulation model. *Izvestiya, Atmospheric and Ocean Physics*, V.38, No. 6, pp. 732-747.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15.
- Elith, J.; Graham, C. H.; Anderson, R. P.; Dudík, M.; Ferrier, S.; Guisan, A.; Hijmans, R. J.; Huettmann, F.; Leathwick, J. R.; Lehmann, A.; Li, J.; Lohmann, L. G.; Loiselle, B. A.; Manion, G.; Moritz, C.; Nakamura, M.; Nakazawa, Y.; Overton, J. McC.; Peterson, A. T.; Phillips, S. J.; Richardson, K. S.; Scachetti-Pereira, R.; Schapire, R. E.; Sobero'n, J.; Williams, S.; Wisz, M. S.; Zimmermann, N. E. 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129-151.
- Escobar, R.; Muñoz, L.; Montoya, J.E.; Tohme, J.; Roca, W. M. 2002. Implementación del sistema RITA® en la propagación a gran escala y en la embriogénesis somática de yuca. Reporte Anual CIAT-Proyecto SB-2. Output 3.
- FAOSTAT. 2010. "Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO)." On line (Consultado Abril 2010): <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>.
- Fretes, F.; Mendoza, C.; Penner, R.; Martínez, M. 2010. Mandioca una opción industrial. Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). Paraguay. 54p.
- Gordon, H.B.; Rotstayn, L.D.; Mcgregor, J.L.; Dix, M.R.; Kowalczyk, E.A.; O'farrell, S.P.; Waterman, L.J.; Hirst, A.C.; Wilson, S.G.; Collier, M.A.; Watterson, I.G.; Elliott, T.I. 2002. The CSIRO Mk3 Climate System Model [Electronic publication]. Aspendale: CSIRO Atmospheric Research. (CSIRO Atmospheric Research technical paper; no. 60),130p.
- Hijmans, R.J.; Graham, C.H. 2006. The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, 12, 2272-2281.
- Hasumi, H.; Emori, S. (Eds.). 2004. K-1 Coupled GCM (MIROC) Description. K-1 Technical Report No. 1, CCSR, NIES and FRCGC, September 2004.
- Hijmans, R.J.; Cameron, S.E.; Parra, J.L.; Jones, P.G.; Jarvis, A. 2005, Very high 64
- Intergovernmental panel on climate change (IPCC). 2001. IPCC Third Assessment Report: Climate Change 2001. IPCC, Geneva
- Lepage, S.P.; Sneath, P.H.A.; Lessel, E.F., Skerman, V.B.D., Seeliger, H.P.R.; Clark, W.A. (editors) (1992). International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). *Bacteriological Code*. Washington, DC: American Society for Microbiology
- Laderach, P.; Collet, L.; Oberthür, T.; Pohlen, J. 2005. Café especial y sus interacciones con factores de producción. In J. Pohlen, ed. Memoria del 2º diplomado sobre cafecultura sustentable, Tuxtla Gutiérrez, México.
- Laderach, P.; Oberthür, T.; Niederhauser, N.; Usma, H.; Collet, L.; Pohlen, J. 2006. Café Especial: Factores, dimensiones e interacciones p. 141-160., In J. Pohlen, et al., eds. El cafetal del futuro: Realidades y Visiones. Shaker Verlag Aachen, Germany.
- Laderach, P.; Vaast, P.; Oberthür, T.; O'Brien, R.; Nelson, A.; Estrada, L.D.L. 2006. Geographical analyses to explore interactions between inherent coffee quality and production environment. 21st International Conference of Coffee Science ASIC 2006 Montpellier, September 2006.
- Lee, I.M.; Gundersen, D.E.; Davis, R.E.; Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169
- MADR. 2010. Observatorio agrocadenas Colombia, IICA-MADR. Consultado Abril 2010. En: <http://www.agrocadenas.gov.co/>.
- MAG. 2007. Informe censo raíces tropicales, piña, plátano, papaya y mamon chino. Costa Rica.
- Malmström, C.M.; Field, C.B. 1997. Virus induced differences in the response of oat plants to elevated carbon dioxide. *Plant Cell Environment* 20:178-88.

- Marqués, R.N.; Teixeira, D.C.; Yamamoto, P.T.; Lopes, J.R.S. 2012. Weedy hosts and prevalence of potential leafhopper vectors (Hemiptera: Cicadellidae) of a phytoplasma (16SrIX group) associated with Huanglongbing symptoms in citrus groves. *Journal of economic entomology*, 105(2), 329-337.
- Oliveira, S.A.S.; Abreu, E.F.M.; Araújo, T.S.; Oliveira, E.J.; Andrade, E.C.; Garcia, J.M.P.; Alvarez, E. 2014. First report of a 16SrIII-L phytoplasma associated with frogskin disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Brazil. *Plant disease*, 98(1):153-153
- Pardo, J. M.; Mejia, J. F.; Álvarez, E. 2011. Desarrollo de qPCR para Detección y Cuantificación de Candidatus Phytoplasma Subgrupo 16 SrIII-L y dsRNA Virus Asociados con la Enfermedad del Cuero De Sapo En Yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Fitopatología Colombiana* 35(1): S138
- Phillips, S.J.; Dudik, M. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*, 31: 161-175
- Phillips, S.J.; Anderson, R.P.; Schapire, R.E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190:231-259.
- Phillips, S.J.; Dudik, M. 2008 Modeling of Species Distributions with Maxent: New Extensions and Comprehensive Evaluation. *Ecography* 31: 161-175.
- Pineda, B.U.; Jayasinghe, U.; Lozano, J.C. 1983. La Enfermedad "Cuero de Sapo" en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *ASIAVA* 4:10-12.
- PROCOMER. 2009. Estadísticas de Comercio Exterior 2009 de Costa Rica. Consultado 14 de junio 2010. Disponible en http://www.procomer.com/Espanol/docs/PDF/estadisticas/Estadisticas_export_2009.pdf
- Ramírez, J.; Jarvis, A. 2008. High resolution downscaled climate change surfaces for global land areas. International Centre for Tropical Agriculture, CIAT.
- Rodríguez, V.G.; Hidalgo, M.E.; Somarribas, Z. T.; Leitón, G. M. 1997. Análisis del Estado Actual Del "Cuero de Sapo" (complejo viral) y la tecnología empleada por los productores de yuca en la Región Huetar Norte de Costa Rica. Tesis de Licenciado en Ingeniería en Agronomía. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos. 103 P.
- Sforza, R.; Clair, D.; Collin, E.; Larrue, J.; Boudon-Padieu, E.; Hourdel, J.; Jeanneau, A. 2004. Detection and prophylaxis of Elm Yellows phytoplasma in France. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 13(1): 71-80.
- Tatineni, T.; Sagaram, U.; Gowda, S.; Robertson, C.; Dawson, W.; Iwanami, T.; Wang, N. 2008. In planta distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98:592-599.
- Weintraub, P.G.; Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* 51:91-111

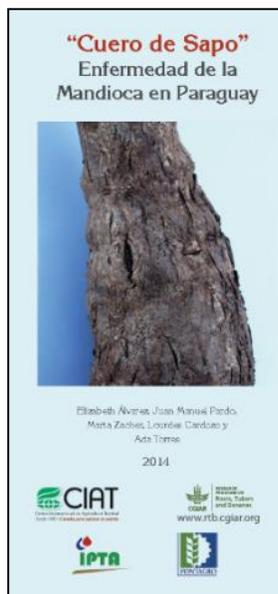
Anexos

Publicaciones Divulgativas

Cartillas



Folleto



Abstracts

First report of hypovirulence between a reovirus and phytoplasma 16SrIII-L associated with frogskin disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

E. ALVAREZ (1), J. M. Pardo (1)
(1) CIAT, Cali, Colombia
Phytopathology 104(Suppl. 3):S3.7

Frogskin disease attacks cassava roots, giving them a cork-like appearance and covering them with longitudinal "lips". It reduces yield by as much as 90%. Causal agents of the disease are believed to be phytoplasma 16SrIII-L and a reovirus (CFSV). However, for more than 20 years, the role that each agent plays in the disease was unknown. The qPCR technique, involving TaqMan® probes, was used to evaluate the presence of both phytoplasma and reovirus in 158 stakes (vegetative seed) cut from cassava plants infected with frogskin disease. In 41.77% of samples, only the phytoplasma was detected and, in 13.29%, only the virus was found. Both microorganisms were found together in another 22.52%, while, for the remaining 22.42%, neither microorganism was detected. The stakes were then planted in a screenhouse and harvested after 3 months of growth. Plants in which both reovirus and phytoplasma were detected showed a yield increase of 20%, a reduced level of severity by 30%, and fewer diseased roots, compared with those plants in which only the phytoplasma was detected. The finding that the phytoplasma's pathogenicity should weaken in roots carrying both reovirus and phytoplasma suggested the phenomenon of hypovirulence. Viruses with double-stranded RNA (dsRNA) are extensively found in association with hypovirulence of fungi. However, this is the first report of a virus with dsRNA causing hypovirulence in a phytoplasma.

A real-time PCR assay to detect and quantify 16SrIII-L and 16SrI phytoplasmas associated with cassava frogskin disease in Costa Rica and Paraguay

J. M. PARDO (1), M. J. Truke (1), L. Cardozo (2), I. Varela (3), E. Alvarez (1)
(1) CIAT, Palmira, Colombia; (2) Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA), Asunción, Paraguay; (3) Tecnológico de Costa Rica sede San Carlos (TEC), Quesada, Costa Rica
Phytopathology 105(Suppl. 1):S1.3

Cassava has the ability to grow on marginal lands, it tolerates drought, and it can grow in low-fertility soil. Several diseases, including cassava frogskin disease (CFSD), threaten the sustainability of cassava production. Recently, this disease was discovered to be associated with infection by phytoplasmas of groups 16SrIII-L and 16SrI. The disease is exponentially propagated through asexual seed, creating a demand for disease-free planting materials. Two TaqMan® probes were designed for the microorganisms, based on the *rp* gene (16SrIII-L phytoplasma) and 16S rRNA gene (16SrI phytoplasma). We used qPCR to obtain a sensitivity that was 100- and 1,000-fold higher than that obtained from nested PCR. In Paraguay, phytoplasma belonging to groups 16SrIII-L and 16SrI was detected in the localities of Caaguazú, Isla Solá, and Barrientos Cue. In Costa Rica, phytoplasma from group 16SrIII-L was detected in the localities of Aguas Zarcas, Pital, Los Lagos, La Merced, Los Chiles, Alajuela, Fortuna, and Guápiles. The CFSD symptoms observed in Paraguay were less severe than those observed in Costa Rica, where phytoplasma group 16SrIII-L showed greater disease severity. With the qPCR technique, both phytoplasmas could be detected and cassava planting certified disease-free, thus allowing germplasm exchange.

Vol. 105 (Supplement 1), No. 3, 2015 S1.3

A portable field pathogen-detection system for disease-free planting materials

E. ALVAREZ (1), J. M. Pardo (2), M. J. Truke (2)
(1) Phytopathologist/CIAT, Cali, Colombia; (2) CIAT, Cali, Colombia
Phytopathology 105(Suppl. 1):S1.5

Cassava frogskin disease is characterized by the presence of woody roots that are cork-like, brittle, and opaque. The peel is thick and will not lift off easily. It is marked by lip-like depressions that join each other in such a way as to resemble a net or honeycomb. The disease disseminates through the use of vegetative seed from fields of infected cassava. A diagnostic technique is needed that will guarantee cassava seed health in the field. The use of deep sequencing indicated that the best region for developing primers for the loop-mediated isothermal amplification kit (LAMP) is the 16S rDNA gene because it is a tandem region (more than one copy of the gene per cell) that is polymorphic for different phytoplasma groups. For LAMP reactions, fluorochrome hydroxynaphthol blue, which does not need observation under UV light, was used. For reactions in the field, a prototype incubator was developed, involving a 5-W solar panel, 12V 12Ah battery, voltmeter, and

Vol. 105 (Supplement 1), No. 3, 2015 S1.5

The metabolism of carbohydrates in roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) infected with frogskin disease

E. Alvarez (1), J. M. Pardo (2), D. Dufour (3), J. L. Moreno (2), E. ALVAREZ (2)
(1) CIAT, Cali, Colombia; (2) CIAT, Palmira, Colombia; (3) CIRAD-CIAT, Palmira, Colombia
Phytopathology 104(Suppl. 3):S3.7

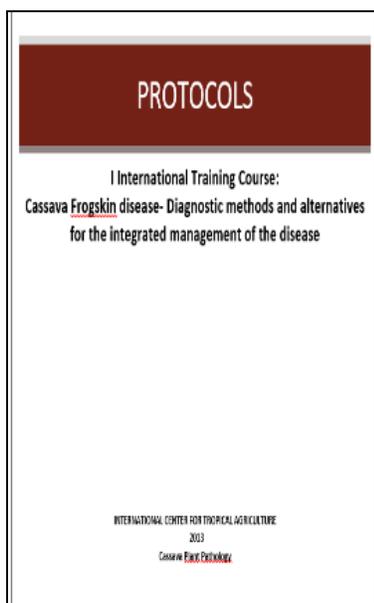
Cassava roots with symptoms of frogskin disease (CFSD) characteristically possess longitudinal "lips" and a peel that has a cork-like aspect. Yields, comprising bulked and starchy roots, are low. Previous studies reported that the phytoplasma 16 SrIII-L is associated with CFSD. However, the plant-pathogen interaction and the pathogenic effects on the host are unknown. The study's objective was therefore to discover the changes occurring in the metabolism of carbohydrates in cassava roots, both in the presence and absence of symptoms. Samples were taken from healthy and diseased roots of two cassava varieties: Valencia and Señorita. The diseased roots were selected for different levels of severity of attack. Parameters were dry matter content and concentrations of organic acids, reducing sugars, and total sugars, using HPLC liquid chromatography. Malic acid was found to be more highly concentrated in diseased roots, correlating with the amounts of reducing and total sugars, particularly fructose ($R^2 = 95\%$). Because of the small quantity of stored starch, the percentage of dry matter in diseased roots is less than that found in healthy roots. That is, in the diseased roots, starch probably converts into fructose and glucose during the Krebs cycle. These findings contribute towards understanding the pathogenic effects of phytoplasma 16 SrIII-L in cassava roots attacked by CFSD. They are also consistent with reports on phytoplasmas attacking other plant species.

***In vitro* isolation of a phytoplasma associated with frogskin disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**

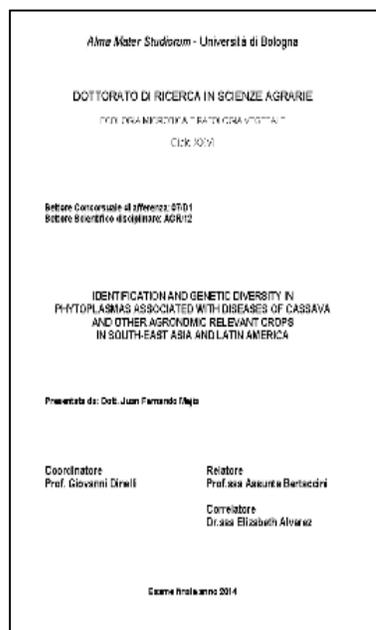
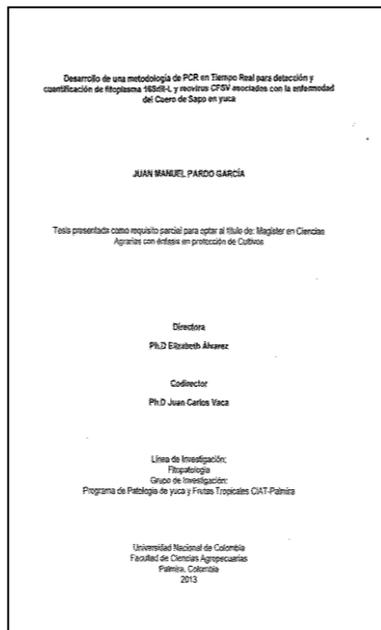
C. A. BETANCOURTH (1), J. M. Pardo Garcia (2), M. J. Truke Arango (2), J. E. Muñoz (3), E. Alvarez (2)
(1) Universidad de Nariño, Palmira, Colombia; (2) CIAT, Palmira, Colombia; (3) Universidad Nacional, Palmira, Colombia
Phytopathology 105(Suppl. 1):S1.6

In Colombia, frogskin disease is a limiting factor of the cassava crop, causing as much as 90% losses of roots. Recent studies at CIAT, Colombia, indicate an association of a phytoplasma with diseased plants. To advance knowledge on the disease and the role of the phytoplasma in its development, this study aims to isolate the microorganism *in vitro*. Fragments of roots, petioles, stems, leaves, and embryos from diseased cassava plants were planted in Phytoplasma *in vitro* liquid medium (PivL) and incubated at 25°C. When the PivL changed color from red to orange, an aliquot of 50 µL was then transferred to Phytoplasma *in vitro* solid medium (PivS). This medium was kept under anaerobic conditions and at one atmosphere at 95% N and 5% C. The presence of phytoplasmas was verified, using the techniques of nested PCR, qPCR, RFLP, and sequencing. Moreover, optical and transmission electron microscopy was used to examine the solid medium. The PivL medium changed color between 5 and 10 days when root and embryo tissues were used, and colonies on PivS were observed after 12 to 15 days. The molecular tests showed 450-bp bands with primers M2/M1, polymorphic patterns similar to those of group III, and sequences with 99% homology with cassava frogskin disease phytoplasma from both media. Photographs of colonies of 1-mm diameters (20X) were also taken. Pleomorphic cells without walls and measuring between 0.5 and 2 microns were obtained from the solid medium. This is the first report on the isolation of a phytoplasma associated with cassava frogskin disease, using an artificial culture medium.

Protocolo



Tesis de Posgrado



Publicaciones Científicas

1 **Relationships between a rosetta and phytoplasma 16SrIII-L associated with**
 2 **Ringblat disease of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**
 3
 4
 5 Parés, J.M. and E. Alvarez, Plant Pathology, International Center for Tropical
 6 Agriculture (CIAT), Cali, Colombia
 7
 8
 9 Corresponding author: Elizabeth Alvarez, e-mail: ealvarez@ciat.org
 10
 11 Accession numbers: GenBank number
 12
 13 All authors have reviewed the manuscript and approve its submission to *Plant Disease*. The
 14 manuscript is not being submitted elsewhere.

Parés, J.M. et al. *Plant Disease* Page 1

1 **ASILAMIENTO BIOLÓGICO Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD CON**
 2 **PHYTOPLASMA 16SrIII-L ASOCIADO A CUERO DE SAPO DE YUCA**
 3 **(*Manihot esculenta* Crantz)**
 4
 5
 6 Betancorrib, C., Parés, J.M., and E. Alvarez, Plant Pathology, International Center for
 7 Tropical Agriculture (CIAT), Cali, Colombia
 8
 9
 10 Corresponding author: Elizabeth Alvarez, e-mail: ealvarez@ciat.org
 11
 12
 13 Accession numbers: GenBank number: **KF118785, KF118786, KF581137, KF118787,**
 14 **KF118788, KF118789, KF581135, KF581136, KF581137 y KF581135.**
 15
 16
 17 All authors have reviewed the manuscript and approve its submission to *Plant Disease*. The
 18 manuscript is not being submitted elsewhere.

Using LAMP Amplification Technology to Detect a *Phytoplasma* Associated with Cassava
Ringblat Disease

E. Alvarez, J.M. Parés, and M. J. Trujillo, Plant Pathology, International Center for Tropical
 Agriculture (CIAT), Cali, Colombia

Corresponding author: Elizabeth Alvarez, e-mail: ealvarez@ciat.org

Accession numbers: GenBank number: **KF118785- KF118789, KF581137- KF581137,**
KF701592, KF701594, KF701596, KF701599, KF701590, KF701591 - KF701593, ~~KF701594~~,
KF701454, KF701454, KF701498, KC216756

All authors have reviewed the manuscript and approve its submission to *Plant Disease*. The
 manuscript is not being submitted elsewhere.

E. Alvarez et al. *Plant Disease*

Congresos internacionales

Biotecnología y Sociedad,
 diálogos para un desarrollo sostenible.

18 al 22 de Noviembre 2013
 Sala Gran Hotel Provincial
 Mar del Plata | ARGENTINA

59 PCCMCA
 Programa Cooperativo Centroamericano
 para el Mejoramiento de Cultivos y Animales

IOM 2014

2014 Caribbean Division Meeting
 July 9-10, 2014 (joint with the Caribbean Food Crop Society (CFCOS))
 in the US Virgin Islands at the Sugar Bay Resort and Spa

2014 APS-CPS Joint Meeting
 August 6-12, 2014 (co-located with the Caribbean Food Crop Society (CFCOS))
 in the US Virgin Islands at the Sugar Bay Resort and Spa

2014 APS Northeastern Division Meeting
 October 29-31, 2014
 Sheraton Portsmouth Harborside Hotel in Portsmouth, New Hampshire