

# CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. PROVENIENTE DE LA ZONA DE PRODUCCIÓN DE AJONJOLÍ EN VENEZUELA

Andrea Martínez-Hilders<sup>1</sup> y Hernán Laurentin<sup>1</sup>

## RESUMEN

La enfermedad causada por *Macrophomina phaseolina*, denominada pudrición carbonosa, representa una amenaza para la producción de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) en Venezuela. Debido a que una de las estrategias de control es el uso de resistencia genética, se requiere información acerca de la variabilidad del patógeno. Con el fin de caracterizar fenotípicamente y molecularmente a este hongo en la zona de producción de ajonjolí de los llanos occidentales de Venezuela, se determinó la velocidad de crecimiento, producción de microesclerocios, color de micelio y presencia de micelio aéreo en siete aislamientos del hongo obtenidos de material vegetal enfermo en distintos puntos ubicados en una zona de aproximadamente 2500 km<sup>2</sup>. La caracterización molecular se logró mediante RAPD con el uso de 13 oligonucleótidos. En la evaluación fenotípica se observó variabilidad en la velocidad de crecimiento (entre 0,70 y 0,93 mm·h<sup>-1</sup>), producción de microesclerocios (entre 18 y 56 en 100 µL) y presencia de micelio aéreo (en sólo dos aislamientos). El color de micelio fue gris oscuro para todos los aislamientos. Con relación a la caracterización molecular se lograron productos de amplificación con 10 de los oligonucleótidos, los cuales generaron 81 bandas, todas polimórficas. Mediante un fenograma y un análisis de coordenadas principales se generó un agrupamiento muy similar entre los aislamientos, en el cual, aún cuando no hay una relación muy clara con respecto a la procedencia geográfica, hay la tendencia a separarlos según la margen del principal curso de agua (río Acarigua) de la zona en la cual fueron colectados.

**Palabras clave adicionales:** *Sesamum indicum*, pudrición carbonosa, RAPD, microesclerocios, velocidad de crecimiento

## ABSTRACT

### Phenotypic and molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. coming from the sesame production zone in Venezuela

Charcoal rot is a disease caused by *Macrophomina phaseolina*, which is considered an important threat to sesame production in Venezuela. One of the strategies to control the pathogen is the use of genetic resistance, but for using it, it is required wide knowledge about its genetic variability. To characterize *Macrophomina phaseolina* coming from Venezuelan sesame production area, by using morphological traits and molecular markers, some attributes were determined as growth velocity, microsclerotia production, mycelium colour, aerial mycelium presence, and RAPD by using 13 primers for seven fungus isolates collected from about 2500 km<sup>2</sup>. Variability for growth velocity (0.70-0.93 mm·h<sup>-1</sup>), microsclerotia production (18-56 in 100 µL) and aerial mycelium presence was observed. Mycelium colour was dark grey for all the isolates. Ten out of the 13 primers used were able to amplify the DNA, generating 81 bands (100 % polymorphic). Phenogram and principal coordinates analysis displayed a similar pattern for grouping the 7 isolates. There was not a consistent relationship between geographical origin and grouping based on RAPD, although there was a trend to separate isolates according to the margin of Acarigua River, from where they were collected.

**Additional key words:** *Sesamum indicum*, charcoal rot, RAPD, microsclerotia production, growth velocity

## INTRODUCCIÓN

El ajonjolí es un cultivo de rotación de suma importancia en Venezuela, lo cual se evidencia en una superficie de siembra que en los últimos diez años promedia las 45.000 ha (FEDEAGRO, 2012). Poco más de 95 % de su producción ocurre

en los llanos del estado Portuguesa, en la cuenca del río Acarigua, en suelos caracterizados por una alta capacidad de retención de humedad, lo cual permite a este cultivo completar su ciclo en ausencia de precipitaciones y sólo con la humedad retenida en el suelo del ciclo de lluvias anterior.

El ajonjolí puede ser afectado por diferentes

Recibido: Marzo 8, 2012

Aceptado: Septiembre 17, 2012

<sup>1</sup> Dpto. Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centrocidental Lisandro Alvarado. Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: andreahilders@hotmail.com; hlaurentin@ucla.edu.ve

estreses bióticos, y en Venezuela estos problemas están actualmente restringidos a mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Laurentin y Pereira, 2001) y hongos del suelo tales como *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* (Pineda y Ávila, 1988) y *Phytophthora parasítica* (Mazzani, 1999).

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich es el agente causal de la pudrición carbonosa en más de 300 especies cultivadas. Es un hongo que causa daño al producir obstrucción del tejido vascular en raíces y en las zonas del tallo aledañas al suelo (Wyllie, 1989). Las condiciones ambientales propicias para su acción sobre hospederos susceptibles son altas temperaturas y poca humedad en el suelo (Odovsky y Dunkle, 1979), las cuales son justamente las condiciones de producción predominantes durante el ciclo del ajonjolí.

Weiland y Sundsbak (2000) señalan que la identificación adecuada de organismos patógenos de plantas cultivadas es un factor crítico al momento de establecer estrategias de manejo y control de enfermedades, indicando que para esto se hace necesaria la caracterización morfológica y genética de dichos patógenos. Laurentin (2011) define la caracterización de individuos o poblaciones como la descripción de éstos basada en determinado atributo, pudiendo ser básicamente morfológica o molecular. Karp et al. (1997) consideran que ambos tipos de caracterización son complementarios en cuanto a la información que proveen.

La zona de producción de ajonjolí está altamente infestada con grandes cantidades de microesclerocios (Cardona, 2006) que actúan como inóculo primario (Dhingra y Sinclair, 1978); sin embargo, no se tiene conocimiento acerca de la diversidad existente entre aislamientos logrados

en esta área geográfica. Por tal razón, en el presente trabajo se planteó como objetivo evaluar la diversidad genética de *Macrophomina phaseolina* en la principal zona de producción de ajonjolí de Venezuela mediante caracteres fenotípicos y moleculares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento del hongo.** Para la obtención de varios aislamientos del hongo se tomaron muestras vegetales de siembras comerciales que presentaran sintomatología de pudrición carbonosa en los municipios Esteller, Turén y Santa Rosalía del estado Portuguesa. Los puntos geográficos de colecta se hicieron mediante un muestreo sistemático mediante dos transectas en sentido norte-sur. Estas transectas fueron carreteras que atraviesan la zona de producción de ajonjolí (un cuadrado de aproximadamente 50 km x 50 km) tomándose las muestras cada 10 km aproximadamente. Una vez obtenido el tejido enfermo se procedió según la metodología empleada por Jana et al. (2005), Wang et al. (2011) y Csöndes et al. (2011). Para esto, secciones pequeñas del tejido se colocaron en agar papa dextrosa (medio PDA) en cápsulas de Petri, esperando el crecimiento micelial de *M. phaseolina* para transferir secciones de medio PDA con micelio a otra cápsula que también contenía PDA, operación que se repitió tantas veces como fue necesario para obtener aislamientos puros. De esta forma se obtuvieron seis aislamientos del hongo procedentes de cultivos de ajonjolí. Adicionalmente se obtuvo un aislamiento procedente de un cultivo de caraota (*Phaseolus vulgaris*) que fue utilizado con fines comparativos (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Sitio de muestreo para la obtención de los aislamientos de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí (excepto el aislamiento 2-2011 que fue obtenido en caraota) en los municipios Esteller, Turén y Santa Rosalía del estado Portuguesa

| Nombre del aislamiento | Sitio de colecta |               |                |
|------------------------|------------------|---------------|----------------|
|                        | Latitud          | Longitud      | Altitud (msnm) |
| 2-2010                 | 9° 12' 41,0"     | 68° 56' 47,8" | 100            |
| C3-2010                | 9° 07' 43,2"     | 69° 01' 44,5" | 114            |
| 2-2011                 | 9° 18' 10,4"     | 69° 07' 13,9" | 133            |
| 30-2011                | 9° 18' 10,4"     | 69° 07' 13,9" | 133            |
| 36-2011                | 9° 07' 38,3"     | 68° 53' 19,8" | 90             |
| 37-2011                | 9° 06' 34,1"     | 69° 02' 31,3" | 96             |
| 41-2011                | 9° 09' 4,90"     | 68° 54' 06,0" | 100            |

**Caracterización fenotípica.** La velocidad de crecimiento fue medida mediante dos procedimientos: a) en cápsulas de Petri para estimar la velocidad para generar micelio partiendo de hifas, y b) en placas ELISA para evaluar la velocidad de germinación del microesclerocio (no a partir de micelio). Para el primer caso, se colocó 1 cm<sup>2</sup> de medio PDA que contenía micelio en crecimiento activo en el centro de una cápsula de Petri, también con PDA. Cada 12 h se midió el crecimiento micelial en dos direcciones perpendiculares para tener el diámetro promedio del crecimiento. Las mediciones se hicieron hasta que el micelio ocupó la totalidad de las cápsulas y permitieron estimar el área de crecimiento en el transcurso del tiempo. Para el segundo caso, se midió la densidad óptica del micelio en las placas ELISA de 96 celdas con fondo plano utilizando un espectrofotómetro Termo Multiskan FC. Se colocaron 50 microesclerocios de cada aislamiento en cada una de 64 celdas que contenían 200 µL de caldo de papa dextrosa. Los microesclerocios se obtuvieron del macerado de 1 cm<sup>2</sup> de medio PDA que contenía al hongo en crecimiento durante 2 semanas, en 1 mL de agua destilada. La densidad óptica en cada celda fue medida cada 12 horas a una longitud de onda de 450 nm. Cada celda representó una unidad experimental, conformando así un diseño completamente al azar con 64 repeticiones. La densidad óptica se consideró un indicador del crecimiento micelial, puesto que mientras mayor fuese este último, mayor sería la interferencia para la transmisión del haz de luz.

Se cuantificó la producción de microesclerocios mediante la toma de 1 g de medio PDA, con micelio y microesclerocios, de la sección ubicada a 5 cm del centro de la cápsula. Sobre esta cápsula que contenía medio se había colocado una semana antes 1 cm<sup>2</sup> de medio con micelio en crecimiento activo. La sección tomada se maceró en 10 mL de agua destilada y de este volumen se extrajeron cinco alícuotas de 100 µL, las cuales se dispensaron sobre papel filtro para realizar la cuantificación de los microesclerocios bajo una lupa estereoscópica. El valor reportado corresponde al promedio sobre las cinco alícuotas.

Asimismo, se determinó el color del micelio y la presencia o ausencia de micelio aéreo en los siete aislamientos del hongo. Se utilizó un diseño completamente al azar con siete tratamientos (los

aislamientos) y seis repeticiones. Las unidades experimentales estuvieron representadas por una cápsula de Petri. El color del micelio se registró todos los días durante 7 días en cada cápsula de Petri de las utilizadas para medir velocidad de crecimiento; se procedió igualmente para determinar la presencia o no de micelio aéreo.

**Caracterización molecular.** El ADN requerido para hacer la caracterización molecular fue obtenido de micelio que creció en medio de caldo papa dextrosa en celdas de placas de ELISA de fondo plano. De esta manera se obtuvieron 150 mg de micelio (peso fresco) de cada aislamiento los cuales se maceraron en presencia de 1 mL de buffer de Dellaporta et al. (1983) (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA), 10 µL de mercaptoetanol y 10 µL de proteinasa K (20 mg·mL<sup>-1</sup>). El macerado se incubó por 20 min a una temperatura de 65 °C. Posteriormente se agregaron 500 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y la mezcla fue constantemente mezclada por 5 min, la cual se centrifugó durante 10 min a 14.000 rpm. La fase superior fue transferida a otro tubo de 1,5 mL y se repitió la adición de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) con su respectiva centrifugación y transferencia de la fase superior a otro tubo de 1,5 mL. Al contenido del tubo se le agregaron 750 µL de isopropanol previamente enfriado y 5 µL de acetato de amonio 5 M. La mezcla se dejó en reposo durante 30 min en escarcha, y luego se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm. Se descartó la fase líquida y el pellet resultante se lavó dos veces con 200 µL de etanol 80 %. Se agregaron 50 µL de buffer TE para que el pellet se solubilizara. A las 24 h se agregaron 175 µL de acetato de amonio 5M a la suspensión, la cual se incubó por 30 min a 0 °C. Posteriormente se hizo una centrifugación a 14.000 rpm por 20 min, y del sobrenadante se transfirieron 100 µL a un nuevo tubo de 1,5 mL con 80 µL de isopropanol frío. Luego de agregaron 1,5 µL de ARNasa, haciendo la incubación por 1 h a 37 °C. Por último, se centrifugó la suspensión por 10 min a 14.000 rpm para obtener el pellet, el cual fue lavado dos veces con etanol 80 % y solubilizado con 50 µL de buffer TE. A las 24 h se comprobó la presencia y la calidad del ADN mediante electroforesis durante 60 min a 60 V en agarosa (0,8 % p/v) en

una cámara horizontal (CBS-MGU.252T) y posterior tinción en bromuro de etidio durante 10 min y lavado en agua durante otros 10 min. El gel obtenido se colocó en un transiluminador con luz ultravioleta y la imagen obtenida fue registrada en un sistema de fotodocumentación UVP VisiDoc-It.

Los ADN así obtenidos se conservaron a 4 °C hasta su uso para el reacción en cadena de la polimerasa. Para la generación de los polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD) se utilizó un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$  para cada combinación de los siete aislamientos con 13 oligonucleótidos de las series OPA, OPC y OPL, que contenía 4  $\mu\text{L}$  de buffer 5X de PCR (Promega), 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  de una mezcla 10 mM de dNTPs, 0,8  $\mu\text{L}$  de gelatina 0,025 % (p/v), 1  $\mu\text{L}$  de uno de los oligonucleótidos con una concentración de 2 mM, 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa de 5 unidades  $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (Promega), 2  $\mu\text{L}$  de ADN de cada aislamiento (para cada reacción individual) con una concentración de aproximadamente 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y 9,5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (Promega). Las reacciones en cadena de polimerasa (PCR) se dieron en un termociclador Thermo Px2 programado para un primer paso de desnaturalización a 93 °C por 2 min, seguido de 45 ciclos, cada uno de ellos consistió en un paso de desnaturalización a 93 °C por 1 min, un paso de alineación del oligonucleótido a 36 °C por 1 min y un paso de extensión a 72 °C por 1 min. Finalmente se programó una extensión a 72°C por cinco min. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa (1,4 % p/v) en 0,5X de buffer TBE conjuntamente con un marcador de PCR de 5 bandas (150, 300, 500, 750 y 1000 pb). Los geles obtenidos se tiñeron con bromuro de etidio y la imagen fue registrada como se explicó anteriormente.

Las áreas obtenidas al estimar velocidad de crecimiento en cápsulas de Petri, y las densidades ópticas obtenidas por espectrofotometría, fueron sometidas a un análisis de varianza donde las fuentes de variación fueron aislamiento, tiempo de medición y la interacción entre ambos. Posteriormente se hizo una prueba de medias de Tukey. Los resultados de ambas metodologías se sometieron a un análisis de correlación de Pearson. La presencia o no de diferencias estadísticas en la producción de microesclerocios

entre aislamientos se determinó mediante un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey. Todos estos análisis se lograron con el programa Statistix v. 8.0.

Las bandas obtenidas de la caracterización molecular fueron codificadas en una matriz binaria (presencia estuvo representada por 1 y ausencia por 0). A partir de esta matriz se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard, y mediante el algoritmo UPGMA se obtuvo un fenograma para establecer las relaciones genéticas entre los aislamientos obtenidos. La validez estadística del fenograma se exploró mediante el coeficiente cofenético de correlación y el método de remuestreo (“bootstrapping”). Adicionalmente se realizó un análisis de coordenadas principales como otra forma de visualizar las relaciones genéticas. Todos estos análisis multivariados se lograron con el programa NTSYSpc v. 2.11T Exeter (Setauket, NY) excepto la prueba de “bootstrapping”, la cual fue lograda con el programa Winboot (IRRI, Manila).

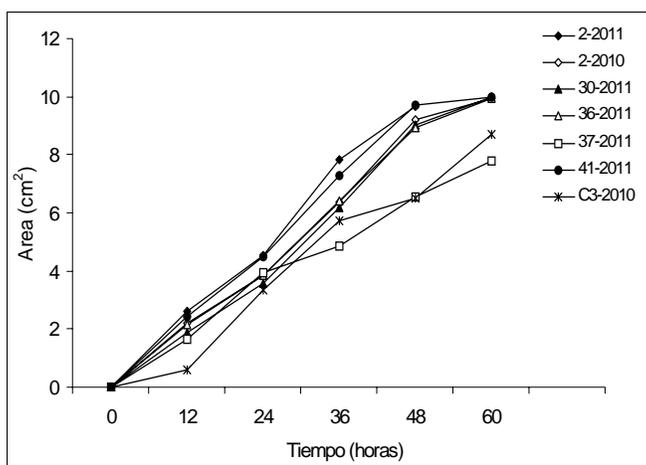
La relación existente entre caracterización molecular y caracterización fenotípica se limitó a la simple observación de patrones que siguieran los fenotipos evaluados en el agrupamiento obtenido mediante RAPD.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

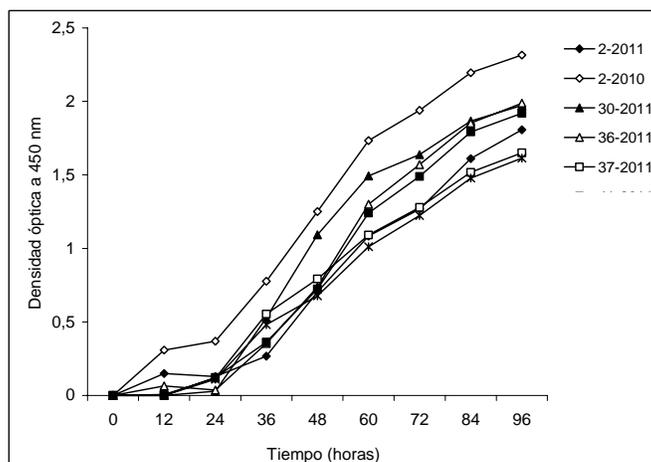
La velocidad de crecimiento estimada por ambas metodologías presentó una interacción aislamiento-tiempo de medición altamente significativa ( $P \leq 0,01$ ). Las Figuras 1 y 2 muestran una velocidad de crecimiento diferencial, dependiendo del tipo de aislamiento. Las pruebas de media (no mostradas) en la metodología de las cápsulas de Petri lograron separar en la hora 48 y 60 a los aislamientos C3-2010 y 37-2011 del resto (Figura 1) por ser éstos los de menor velocidad de crecimiento; en la metodología lograda en las placas de ELISA de forma similar la prueba de medias separó a estos aislamientos del resto en las horas 72, 84 y 96 por ser los de menor velocidad de crecimiento, y a 2-2010 como el de mayor velocidad de crecimiento (Figura 2). La velocidad de crecimiento medida sobre cápsulas de Petri estuvo en un rango de 2,22-3,90  $\text{cm}^2$  en 24 horas, el cual expresado de forma lineal corresponde a diámetros promedio de 1,68-2,23 cm en ese intervalo de tiempo. Este es un rango comparable

con los obtenidos por otros autores tales como Rayatpanah et al. (2009) (2,06-2,53 cm en 24 horas), Sulcra y Franco (2006) (1,16 mm·h<sup>-1</sup>), Beas-Fernández et al. (2006) (1,35 mm·h<sup>-1</sup>) y Mahdizadeh et al. (2011) (0,84-1,50 mm·h<sup>-1</sup>). La correlación entre ambas metodologías resultó no significativa ( $r = 0,31$ ;  $P > 0,05$ ) lo cual se explica por el hecho de que cada una de ellas evaluó distintos procesos, puesto que en cápsulas de Petri se estimó la velocidad de mitosis para generar micelio a partir de hifas, mientras que la otra

evaluó la velocidad de germinación del microesclerocio (sigue siendo mitosis pero no a partir de micelio). Adicionalmente, es necesario considerar que la condición del sustrato utilizado fue diferente en cada caso (uno era sólido y dispuesto en forma horizontal y el otro era líquido y dispuesto en forma vertical). No obstante, en ambas metodologías se observa la tendencia de C3-2010 y 37-2011 a tener una velocidad de crecimiento menor con respecto a los otros cinco aislamientos.



**Figura 1.** Velocidad del crecimiento micelial (en función del área de la colonia) en cápsulas de Petri de siete aislamientos de *Macrophomina phaseolina*



**Figura 2.** Velocidad del crecimiento micelial (en función de la densidad óptica de la colonia) en placas de ELISA de siete aislamientos de *Macrophomina phaseolina*

El Cuadro 2 muestra una amplia variabilidad entre los aislamientos en el número de microesclerocios que producen, dándose valores entre 18 y 56 por cada 100  $\mu$ L de suspensión. La observación en conjunto de velocidad de

crecimiento a partir de micelio, de microesclerocios y la producción de microesclerocios permite suponer algunas características de los aislamientos en lo referente a su agresividad. El aislamiento 2-2010 estuvo entre los de mayor velocidad de

crecimiento en ambas evaluaciones y adicionalmente fue el que mayor cantidad de microesclerocios produjo, en tal sentido pudiera señalarse que tiene los atributos para ser más agresivo que el resto. Por el contrario, el aislamiento 37-2011 tiene las características de ser poco agresivo, pues presenta una velocidad de crecimiento baja, tanto desde micelio como desde microesclerocios, y adicionalmente produce pocos microesclerocios.

**Cuadro 2.** Producción de microesclerocios de siete aislamientos de *Macrophomina phaseolina*

| Aislamiento | Nº de microesclerocios |
|-------------|------------------------|
| 2-2010      | 56 a                   |
| 30-2011     | 54 a                   |
| C3-2010     | 53 a                   |
| 36-2011     | 41 b                   |
| 37-2011     | 24 c                   |
| 41-2011     | 21 cd                  |
| 2-2011      | 18 d                   |

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

En cuanto a la determinación del color del micelio se pudo observar que durante las primeras 24 horas el micelio era de color blanco para todas las cepas, expresando variación a partir de las 36 horas, tornándose de una coloración más oscura (gris oscuro) en algunas de las unidades experimentales del aislamiento 2-2011, 2-2010, 41-2011, así como en todas las de los aislamientos 30-2011 y 36-2011. En estos dos últimos se observó la presencia de microesclerocios. Finalmente la coloración oscura se generalizó hacia el interior de las 42 cápsulas y alcanzó un color negro uniforme para el tiempo correspondiente a las 60 horas en todas las unidades experimentales. El color oscuro se debe a la producción de esclerocios, los cuales son de color negro y oscurecen el micelio originalmente blanco. Es posible que en cepas que producen mayor cantidad de esclerocios, el micelio parezca más oscuro, lo cual se habría cumplido en varios de los aislamientos, aunque no en los 2-2011 y 41-2011. Sólo los aislamientos 37-2011 y 41-2011 presentaron micelio aéreo. Los resultados del presente trabajo coinciden parcialmente con los de Beas-Fernández et al. (2006) quienes reportan para dos cepas del hongo aisladas de ajonjolí que crecieron en medio PDA un pobre desarrollo de

micelio aéreo, color gris del micelio y una alta producción de microesclerocios. A su vez Sulcra y Franco (2006) evaluaron el crecimiento del hongo y reportaron la formación de colonias de aspecto algodonoso, inicialmente blanco que luego se tornaron de un color verde olivo, el reverso de la colonia es negro y de consistencia laxa.

Diez oligonucleótidos de los 13 utilizados permitieron la obtención de productos de amplificación, resultando un total de 81 bandas de las cuales todas fueron polimórficas. Más del 50 % de las bandas tuvieron un tamaño que osciló entre 300 y 750 pb (Cuadro 3), y la relación número de bandas por cada oligonucleótido usado fue de 8,1, valor superior a las 3,36 bandas por oligonucleótido reportado por Almeida et al (2003). A diferencia del presente trabajo, Purkayastha et al. (2006) reportaron productos de amplificación en todos los oligonucleótidos de la serie OPA (OPA-01 hasta OPA-20). Jana et al. (2003) determinaron que el oligonucleótido OPA-13 amplificó en todos los aislamientos que ellos utilizaron, lo cual no ocurrió en el presente trabajo, corroborándose así que el valor que tenga un determinado oligonucleótido en la caracterización molecular de una especie dependerá de las muestras o poblaciones que se utilicen.

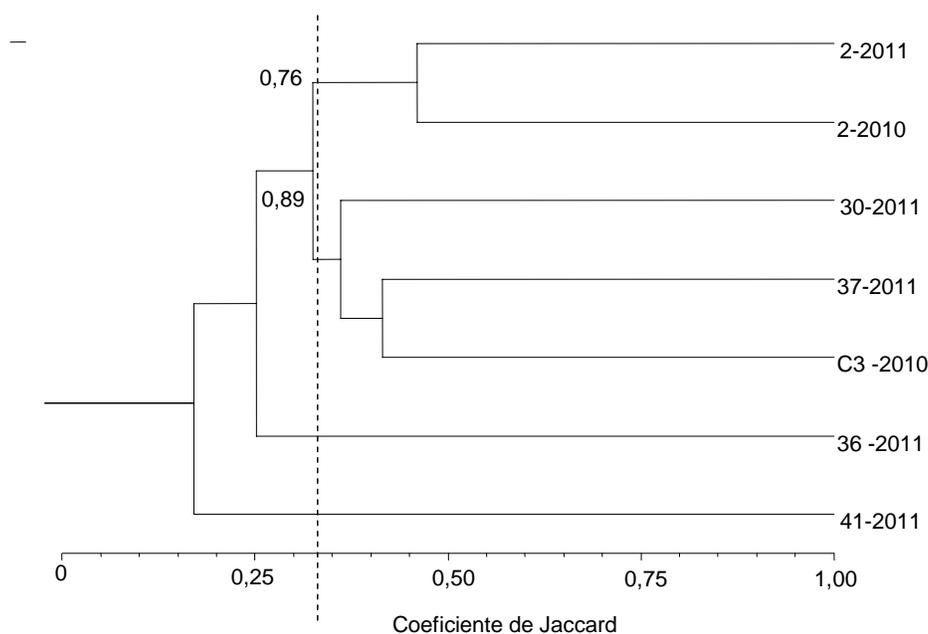
Los coeficientes de similitud de Jaccard tuvieron un valor mínimo de 0,11 entre los aislamientos C3-2010 y 41-2011, y un valor máximo de 0,46 entre 2-2010 y 2-2011. El fenograma (Figura 3) a un nivel de similitud de 0,34 permite identificar dos grupos con valores altos de “bootstrapping” lo cual asegura la confiabilidad en dicho agrupamiento. Uno de los grupos está constituido por 2-2010 y 2-2011 y el otro por 30-2011, 37-2011 y C3-2010. Los aislamientos 36-2011 y 41-2011 no pertenecen a ningún grupo a este nivel de similitud de 0,34, es decir, son los que menos parecido tienen al ser comparados con los demás. El valor del coeficiente cofenético de correlación obtenido de 0,84 indica una representación adecuada del algoritmo UPGMA de los coeficientes de similitud entre los aislamientos. La Figura 4 muestra las similitudes de los siete aislamientos en un espacio tridimensional. En ella se observa un patrón parecido al fenograma, observándose que 41-2011 es el que tiene menor similitud con el resto. Laurentin (2009) señala que a pesar de

que el fenograma y coordenadas principales son métodos con fundamentos matemáticos totalmente distintos, los métodos de clasificación jerárquica (en este caso representados por el

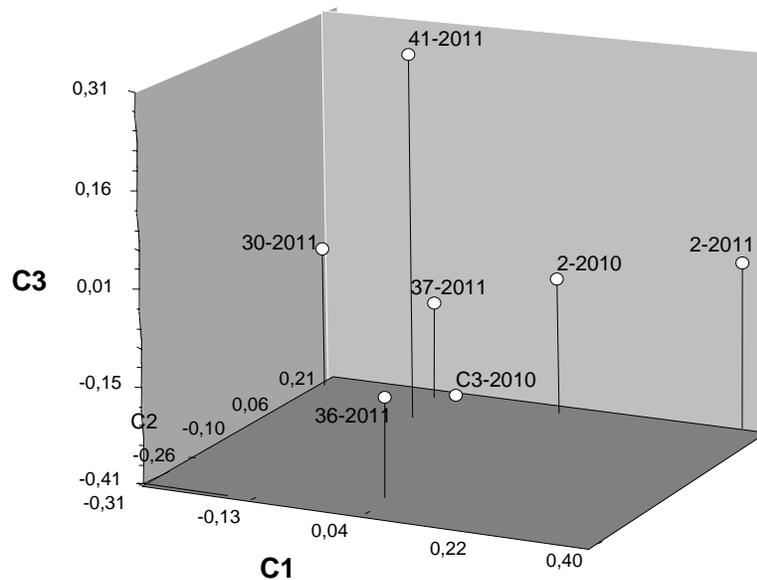
fenograma) y los métodos de ordenación (en este caso representados por coordenadas principales) generalmente arrojan resultados muy similares.

**Cuadro 3.** Número de bandas totales, número de bandas polimórficas y tamaño de bandas para cada uno de los oligonucleótidos que permitieron obtener productos de amplificación al caracterizar siete aislamientos de *Macrophomina phaseolina*

| Oligonucleótido | Secuencia  | N° de bandas | N° de bandas polimórficas | Tamaño de las bandas (pb) |          |         |         |         |
|-----------------|------------|--------------|---------------------------|---------------------------|----------|---------|---------|---------|
|                 |            |              |                           | > 1000                    | 750-1000 | 500-750 | 300-500 | 150-300 |
| OPA-02          | TGCCGAGCTG | 9            | 9                         | 2                         | 2        | 1       | 3       | 1       |
| OPA-03          | AGTCAGCCAC | 15           | 15                        | 4                         | 1        | 3       | 6       | 1       |
| OPA-04          | AATCGGGCTG | 9            | 8                         | 1                         | 2        | 3       | 2       | 1       |
| OPA-05          | AGGGGTCTTG | 9            | 9                         | 3                         | 1        | 2       | 2       | 1       |
| OPA-06          | GGTCCCTGAC | -            | -                         | -                         | -        | -       | -       | -       |
| OPA-07          | GAAACGGGTG | 8            | 8                         | 0                         | 1        | 4       | 3       | 0       |
| OPA-08          | GTGACGTAGG | -            | -                         | -                         | -        | -       | -       | -       |
| OPA-09          | GGGTAACGCC | 6            | 6                         | 2                         | 1        | 1       | 2       | 0       |
| OPA-10          | GTGATCGCAG | -            | -                         | -                         | -        | -       | -       | -       |
| OPA-13          | TCTGTGCTGG | 7            | 7                         | 3                         | 1        | 2       | 0       | 0       |
| OPC-04          | GGGTAACGAA | 5            | 5                         | 2                         | 3        | 0       | 0       | 0       |
| OPC-06          | GTGATCGCTA | 9            | 9                         | 2                         | 1        | 2       | 3       | 1       |
| OPL-08          | TCTGTGCCGC | 5            | 5                         | 0                         | 2        | 3       | 0       | 0       |
| Total           |            | 81           | 81                        | 19                        | 15       | 21      | 21      | 5       |



**Figura 3.** Fenograma obtenido mediante el uso del coeficiente de Jaccard y el algoritmo UPGMA, indicando los valores “bootstrapping” a una similitud de 0,34



**Figura 4.** Representación tridimensional del agrupamiento de siete aislamientos de *Macrophomina phaseolina* mediante análisis de coordenadas principales

No se evidenció ningún patrón definido entre las características fenotípicas evaluadas y el agrupamiento basado en RAPD; sin embargo, todos los análisis realizados sobre los siete aislamientos, tanto los basados en caracteres fenotípicos como los basados en caracteres moleculares, permiten identificar una amplia variabilidad de *M. phaseolina*. La amplia variabilidad genética de este hongo ha sido previamente reportada (e.g. Purkayastha et al., 2006; Csöndes et al., 2011; Mahdizadeh et al., 2011). Sin embargo, en todos los trabajos anteriores se utilizaron aislamientos del hongo provenientes de distintos hospederos, mientras que en el presente trabajo el muestreo fue sobre un área relativamente pequeña dedicada en ciclo de Norte-Verano al cultivo del ajonjolí, por lo cual pudiese haber sido esperada una variabilidad genética menor de la encontrada.

Aún cuando no hay una clara relación entre el origen geográfico de los aislamientos y la diferenciación lograda mediante los RAPD, puede observarse que 2-2010, 36-2011 y 41-2011, que fueron los que más se diferenciaron del resto, están en la margen izquierda del Canal Piloto (canalización del río Acarigua), mientras que los otros cuatro están en la margen derecha del Canal Piloto.

Los aislamientos 2-2011 y 30-2011 fueron colectados en el mismo punto pero de hospederos

distintos. Aun cuando no hay una diferenciación muy evidente de 2-2011 (el único aislamiento que no provino de ajonjolí), sí se observa una diferenciación evidente al ser comparado con 30-2011. Esto podría sugerir cierta especialización dentro de la especie del hongo.

La amplia variabilidad observada en una colección pequeña de tan sólo seis aislamientos es un indicativo de la gran diversidad genética del hongo, aun considerando un solo hospedero. Esto puede ser consecuencia de una evolución relativamente independiente de los distintos aislamientos en las distintas localidades. Poder confirmar esta hipótesis requeriría de un conocimiento de la historia de cada una de las parcelas donde se siembre ajonjolí, es decir, al conocer hasta donde ha alcanzado el intercambio de semilla, considerando ésta el principal vehículo de infección del suelo con este patógeno.

Las estrategias a seguir en el control de este hongo en el cultivo del ajonjolí necesariamente requieren de la consideración de esta variabilidad, por lo cual todo esfuerzo tendiente hacia la obtención de cultivares resistentes a *M. phaseolina* o incluso hacia cualquier forma de control, deben pasar por la evaluación de la variabilidad genética del patógeno. Entre estas estrategias pueden ser mencionadas la zonificación del área de producción de ajonjolí.

## CONCLUSIONES

El presente trabajo logró determinar una amplia variabilidad genética entre los siete aislamientos de *Macrophomina phaseolina* obtenidos de la principal zona de producción de ajonjolí de Venezuela, basada tanto en caracteres fenotípicos como en polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD); sin lograr establecer una clara relación entre las variables fenotípicas determinadas y la caracterización molecular.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, por el financiamiento al proyecto 033-AG-2009.

## LITERATURA CITADA

- Almeida, A., R. Abdelnoor, C. Arrabal, V. Carvalho, D. Jacoud, L. Marin, M. Benato y C. Carvalho. 2003. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatología Brasileira* 28: 279-285.
- Beas-Fernández, R., A. De Santiago A., S. Hernández-Delgado y N. Mayec-Pérez. 2006. Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *Journal of Plant Pathology* 88: 53-60
- Cardona, R. 2006. Distribución vertical de esclerocios de *Macrophomina phaseolina* en un suelo infestado naturalmente en el estado Portuguesa. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 23: 284-291
- Csöndes, I., A. Cseh, J. Taller. 2011. Genetic diversity and effect of temperature and pH on the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. *Molecular Biology Reporter* DOI 10.1007/s11033-011-1094-6
- Dellaporta, S., J. Wood y J. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: versión II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Dhingra, O. y J. Sinclair. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Impresa Universitaria. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil.
- FEDEAGRO. 2012. Estadísticas agrícolas. Producción agropecuaria. [www.fedeagro.org](http://www.fedeagro.org). (consulta del 07/02/2012)
- Jana, T., T. Sharma y N. Singh. 2005. SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycological Research*. 109: 81-86.
- Jana, T., T. Sharma, R. Prasad y D. Arora. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological Research* 158: 249-257.
- Karp A, S. Kresovich, K. Bhat, W. Ayady y T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technology. IPGRI Technical Bulletin N° 2. International Plant Genetic Resources Institute. Roma. Italia
- Laurentin, H. 2009. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 277-292
- Laurentin, H. 2011. *Genética Agrícola*. Editorial Académica Española. Saarbrücken, Alemania.
- Laurentin, H. y C. Pereira. 2001. Incidencia de la mosca blanca sobre seis genotipos de ajonjolí. *Agronomía Tropical (Maracay)* 51(3): 319-335
- Mahdzadeh, V., N. Safaie y E. Goltapeh. 2011. Diversity of *Macrophomina phaseolina* based on morphological and genotypic characteristics in Iran. *Plant Pathology Journal* 27: 128-137
- Mazzani, B. 1999. Investigación y tecnología del cultivo del ajonjolí en Venezuela. Ediciones del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Caracas. Venezuela. Libro en línea URL: <http://ajonjoli.sian.info.ve>
- Odvody, G. y L. Dunkle. 1979. Charcoal stalk rot of sorghum: effect of environment on host-parasite relations. *Phytopathology* 69: 250-254
- Pineda, J. y J. Ávila. 1988. Alternativas para el control de *Macrophomina phaseolina* y

- Fusarium oxysporum* patógenos del ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). *Agronomía Tropical* (Maracay) 38(4-6): 79-84
18. Purkayastha, S. B. Kaur, N. Dilbaghi y A. Chaudhury. 2006. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathology* 55: 106-116.
19. Rayatpanah, S., S. Nanagulyan, S. Alavi y E. Yasari. 2009. Phenotypic variations of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different hosts in Northern Iran. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3: 2908-2913
20. Sulcra, L. y P. Franco 2006. Estudio de la microflora presente en la rizosfera de plantaciones de olivo, *Olea europaea* L., con muerte regresiva en la zona de Yarada del Departamento de Tacna. *Ciencia y Desarrollo* 9: 33-36
21. Wang, L., D. Li, Y. Zhang, J. Huang, Z. Zhang, X. Zhang y X. Zhang. 2011. Biological characteristics of the pathogen causing sesame charcoal rot from the main sesame production areas in China. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 26: 232-238
22. Weiland J. y J. Sundsbak. 2000. Differentiation and Detection of sugar Beet Fungal Pathogens Using PCR Amplification of Actin Coding Sequences and the ITS Region of the Rrna. *Gene*. 84: 475-482.
23. Wyllie, T. 1989. Charcoal rot. *In: Compendium of Soybean Diseases*. J.B. Sinclair y P.A. Backman (eds.). American Phytopathological Society, St. Paul, MN. pp. 30-33.