

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Fusarium* ASOCIADO A PUDRICIÓN BASAL DEL FRUTO EN PITAHAYA (*Selenicereus megalanthus*)¹

Claudia Salazar-González², Liliana Serna-Cock³, Eyder Gómez-López⁴

RESUMEN

Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). El objetivo de este trabajo fue identificar aislamientos patogénicos de *Fusarium* en frutos de pitahaya amarilla afectados por pudrición basal. La caracterización molecular se realizó en diecisiete aislamientos asociados con la enfermedad, colectados en zonas productoras de pitahaya amarilla de los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda, Boyacá y Cundinamarca, en Colombia. Se usó PCR con los cebadores ITS1 – ITS4 y TEF1 α . Las secuencias de los productos de PCR se compararon con las registradas en el Cento Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), y se alinearon usando Clustal W2, se construyeron las relaciones filogenéticas con el programa MEGA 6 con el coeficiente de máxima verosimilitud. Los resultados de secuenciación para los marcadores mostraron que los aislamientos patogénicos correspondieron a *F. oxysporum*. El concepto filogenético confirmó que la pudrición basal de la pitahaya amarilla fue causada por *F. oxysporum*. Se identificó además una especie de *Fusarium* no reportada en el GenBank.

Palabras clave: filogenia, pudrición de la fruta, etiología.

ABSTRACT

Molecular characterization of *Fusarium* associated with basal rot of thefruit of pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). The aim of this study was to identify pathogenic isolates of *Fusarium* in fruits of yellow pitahaya affected by basal rot. Molecular characterization was performed on seventeen isolates associated with the disease, collected in yellow pitahaya producing areas of Valle del Cauca, Risaralda, Boyacá, and Cundinamarca in Colombia. PCR with primers ITS1 - ITS4 and TEF1 α was used. The sequences of the PCR products were compared with the ones registered in National Center for Biotechnology Information (NCBI) and were aligned using Clustal W2 program, the phylogenetic relationships were built with MEGA6 program with the coefficient of maximum likelihood. The sequencing results for the markers showed that pathogenic isolates were *F. oxysporum*. Phylogenetic concept confirmed that basal rot of yellow pitahaya was caused by *F. oxysporum*. A species of *Fusarium* not reported in GenBank was also identified.

Keywords: phylogeny, rot of the fruit, etiology.



¹ Recibido: 23 de setiembre, 2015. Aceptado: 9 de diciembre, 2015. Parte de tesis de doctorado de la primera autora. Posgrado en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Colombia.

² Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas. Pasto, Nariño. Colombia. claudiasalazarg@yahoo.com

³ Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ingeniería y Administración. Colombia. Isernac@unal.edu.co

⁴ Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Colombia. eydgomezlo@unal.edu.co



INTRODUCCIÓN

Enfermedades de las plantas causan importantes pérdidas de producción en la agricultura. Se estima por ejemplo, que las pérdidas de cosechas debido a patógenos de plantas en Estados Unidos es de 33 mil millones de dólares al año (Pimentel et al., 2005). Para dilucidar la interacción patógeno-planta, la identificación de fitopatógenos es uno de los enfoques de investigación indispensable en la búsqueda de estrategias agronómicas de control y manejo de la enfermedad (Boyd et al., 2013), tales como la aplicación de pesticidas, fungicidas, aplicaciones químicas específicas, y mejora en la productividad. En la identificación de microorganismos las características morfológicas han sido la base de la identificación hasta género, nivel de especie, familia, orden y clase. Sin embargo, las cepas, variedades o biotipos dentro de una especie tiene que ser identificada usando características como patogenicidad, bioquímica, propiedades inmunológicas, o secuencias de nucleótidos del ADN genómico (Wiwik et al., 2013).

En Colombia, el cultivo de pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schumann ex Vaupel Moran), se ha constituido en las dos últimas décadas en una especie importante dentro del renglón de exportaciones a países europeos y asiáticos, convirtiéndose en el primer país exportador de esta variedad (Delgado-Millán, 2012). De los cultivos comerciales del mundo, Colombia cultiva el 76,4%, con rendimiento cercano a 10 t/ha (Kondo et al., 2013; Arciniegas et al., 2014). Sin embargo, los cultivos de pitahaya amarilla se encuentran afectados por la enfermedad conocida como la pudrición basal del fruto, la cual genera pérdidas de fruta exportable superiores al 70% (Varón, 2006), e incrementa en un 50% los costos de producción, por el manejo que debe dársele a la enfermedad (Castillo et al., 2005); por lo que se convierte en la principal enfermedad que limita el cultivo de pitahaya amarilla en Colombia.

La pudrición basal inicia con una lesión amarilla en el tallo, en el sitio de unión del fruto con la penca, causando en el fruto apariencia de madurez prematura. La infección avanza hacia el centro del fruto, produciendo pudrición parcial, y afectando hasta el 50% de la superficie (Varón, 2006; Rojas et al., 2008). Finalmente, se observa pudrición blanda o seca de color marrón en la base del fruto (Varón,

2006; Kondo et al., 2013). La enfermedad se hace más evidente cuando se acerca la cosecha (Suárez, 2011). Autores han atribuido la pudrición basal de pitahaya amarilla a diferentes especies, generalmente del género *Fusarium*. *Fusarium moniliforme* y *F. oxysporum*, se indican como los hongos más frecuentes en frutos de pitahaya con síntomas característicos de pudrición basal, y en menor frecuencia a *F. roseum*, *F. equiseti*, *F. chlamyosporum*, *Cephalosporium corda* y *Gliocladium corda* (Bibliowics y Hernández, 1998; Varon, 2006). En pitahaya roja se encontró que el agente causal que producía pudrición en la base del fruto y amarillamiento en los tallos era *Bipolaris cactivora* (Valencia-Botín e Hirota, 2013). Para el caso de pitahaya roja, en Sumatra Occidental la incidencia de pudrición amarilla del tallo (*Hylocereus polyrhizus*) es del 99,5% (Barthana y Nasir, 2013). De igual forma se ha concluido, mediante caracterización molecular, que el agente causal de la pudrición amarilla del tallo en pitahaya roja (*Hylocereus* sp.) es *Fusarium solani* (Wiwik et al., 2013). En la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira se realizó un trabajo de investigación con el fin de aislar, purificar e inocular una población de aislamientos de *Fusarium* provenientes de frutos afectados de diferentes zonas productoras de pitahaya, los ensayos de inoculación permitieron desarrollar síntomas idénticos a los presentados en campo, encontrando aislamientos patogénicos y no patogénicos (Creucí, 2011).

Sin la adecuada identificación a nivel taxonómico del agente causal de la enfermedad, el manejo de la misma es ineficiente, ya que no se conoce el ciclo del patógeno ni de la infección. Por lo tanto, las medidas de control que se emprendan podrían significar un gasto innecesario, sin contar el impacto negativo al ambiente (Agrios, 2005).

Las técnicas basadas en ácido nucleico, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son las más eficaces para detección de patógenos en plantas (Wiwik et al., 2013). Los análisis de las secuencias de DNA usando marcadores de DNA ribosomal, en particular la del espacio interno transcrita ITS, ha sido utilizada ampliamente para solucionar las relaciones taxonómicas a nivel de especie (Alves-Santos et al., 2002). El gen EF 1 α , el cual codifica una parte esencial de la maquinaria de traducción de la proteína, tiene una alta utilidad filogenética. Este gen parece que produce una copia

única en *Fusarium*, y muestra alto polimorfismo en especies estrechamente relacionadas, aún en comparación con porciones ricas en intrones de genes codificantes de proteína tales como calmodulina, beta tubulina e histona H3 (Wulff et al., 2010).

Ante la incertidumbre que existe sobre la especie de *Fusarium* causante de la pudrición basal del fruto de pitahaya amarilla, y su consecuencia en el manejo de la enfermedad se planteó este trabajo con el objetivo de identificar aislamientos patogénicos de *Fusarium* en frutos de pitahaya amarilla afectados por pudrición basal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos de *Fusarium* asociados a pudrición basal

El período de ejecución del presente estudio fue de enero de 2013 hasta junio de 2014. Se utilizaron diecisiete cepas de *Fusarium* spp. aisladas de frutos de pitahaya amarilla afectados con pudrición basal, colectados en zonas productoras de los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda y Cundinamarca, en Colombia. Cultivos puros de *Fusarium* se obtuvieron mediante siembra en superficie en el medio de cultivo papa, dextrosa-agar (PDA), incubados a 28 °C con doce horas de luz y doce horas de oscuridad, durante ocho días. Los hongos se conservaron en agua destilada estéril a una temperatura de -4 °C, en tubos eppendorf. Los códigos utilizados en los aislamientos y los lugares de procedencia de dichos aislamientos, se muestran en el Cuadro 1.

Caracterización molecular

Extracción de ADN

Los diecisiete aislados de *Fusarium* se reactivaron a partir de aislamientos conservados en agua, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Transcurrido el tiempo de incubación, y utilizando una espátula metálica estéril, se recogió el micelio y se depositó en tubos eppendorf de 1,5 ml.

Para la extracción de ADN se utilizó el método descrito por Wilson (2001), modificado por Gómez (2008), así, en cada tubo con micelio se añadió 750

Cuadro 1. Código y procedencia de los aislamientos de *Fusarium* spp. aislados de frutos de pitahaya amarilla afectados con pudrición basal colectados en zonas productoras de los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda, Boyacá y Cundinamarca, en Colombia. Enero-junio, 2013.

Table 1. Code and origin of the isolates of *Fusarium* spp. isolated from yellow pitahaya fruits affected by basal rot collected in producing areas of in Valle del Cauca, Risaralda, Boyacá, and Cundinamarca in Colombia. January-June, 2013.

Aislamiento	Procedencia
2M	El Dobio (Valle)
3M	Fusagasugá (Cundinamarca)
5M*	Banco de germoplasma (UNAL- Palmira)
6M *	Fusagasugá (Cundinamarca)
7M	Banco de germoplasma (UNAL- Palmira)
8M*	Berbeo (Boyacá)
9M	Fusagasugá (Cundinamarca)
11M*	Belén de Umbría (Risaralda)
12M	Fusagasugá (Cundinamarca)
13M	Belén de Umbría (Risaralda)
15M*	Banco de germoplasma (UNAL- Palmira)
16M	Fusagasugá (Cundinamarca)
17M	Berbeo (Boyacá)
18M	Fusagasugá (Cundinamarca)
20M*	Banco de germoplasma (UNAL- Palmira)
21M*	Banco de germoplasma (UNAL- Palmira)
22M	Fusagasugá (Cundinamarca)

*Aislamientos patogénicos / Pathogenic isolates.

μ l de solución tampón (250 ml Tris-HCl 100 mM pH 7,2; 250 EDTA 100 mM y 250 ml dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%), los tubos se agitaron en vortex y se mantuvieron en hielo (0 °C). Posteriormente, se agregó a cada tubo, 3 μ l de proteinasa K (20 mg/ml), los tubos se agitaron nuevamente, y se incubaron a 37 °C durante una hora. Transcurrida la incubación se adicionó a cada tubo 100 μ l de NaCl 5M, para proporcionar la concentración salina necesaria para que el Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) no se confundiera con el ADN. Posteriormente, a cada

tubo se le adicionó 80 μ l de una solución CTAB/NaCl (CTAB al 10% en NaCl 0,7 M), los tubos se agitaron y se incubaron a 65 °C durante 10 min.

Para la purificación del ADN, a cada tubo se le adicionó 700 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), los tubos se agitaron y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se transfirieron a microtubos, a los cuales se les adicionaron 600 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, en proporción de 25:24:1, por tubo; posteriormente, se agitaron. Para eliminar los restos del complejo CTAB, los tubos se mezclaron y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5 min. El fenol se adicionó con el fin de desnaturalizar y precipitar las proteínas, separándolas del ADN que se mantuvo disuelto. Los ácidos nucleicos quedaron suspendidos en la fase superior acuosa.

Los sobrenadantes se transfirieron a microtubos, y se añadieron 600 μ l de isopropanol para precipitar el ADN. Los tubos se enfriaron a -20 °C durante una hora; posteriormente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. Transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante (isopropanol) y se añadió a cada tubo 500 μ l de etanol frío al 70%; los tubos se agitaron y se centrifugaron en las mismas condiciones descritas, durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante (etanol) y los tubos se secaron al vacío en una cámara de flujo laminar, durante dos horas. Finalmente, se diluyó el ADN en 30 μ l de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso para amplificar la región ITS y TEF1 α .

PCR para amplificar la región ITS1 – ITS4.

La región ITS del ADN_r se amplificó con los primers universales descritos por White et al. (1990) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La mezcla para la amplificación se realizó en un volumen de 50 μ l con 5 μ l de 10X PCR tampón (500 mM KCl₂, 100 mM Tris HCl (pH 9) y 1% Tritón X-100), 3 μ l de 50 mM MgCl₂, 3 μ l de ADN a concentración de 20 ng/ μ l, 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa (0,5 μ l), y 1 μ l de 20 μ M de cada cebador ITS1–ITS4. La amplificación se realizó en un termociclador (Agilent Technologies, Sure cycler 8800, de 96 pozos programable, USA). Se siguieron los ciclos de temperatura así, 95 °C por un minuto, para desnaturalizar las muestras; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos; 55 °C por

1 minuto para alineamiento; extensión de 72 °C por 45 segundos; finalmente, elongación a 72 °C por 5 min. Para la lectura se usó un marcador de peso molecular de 1 kb en un gel de agarosa al 1,2%, el gel se corrió a 65V por 100 minutos. Posteriormente, se observó la presencia de fragmentos entre 500 y 600 pb, en un fotodocumentador (Enduro GDS Labnet, USA). Los productos de PCR se secuenciaron mediante el método de Sanger en MACROGEN, Corea. La identidad a nivel de especie se determinó mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (2015).

PCR para amplificar la región TEF 1 α

Se amplificó la región del gen TEF E1 α y E2 α con los cebadores 5'ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3 y 5'-GGAGGTACCAGTGCATCATGTT-3 (O'Donnell et al., 1998).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ l, se adicionaron 25 μ l de Go taq Green Master mix, 1 μ l de cada iniciador, 2 μ l de ADN (100 ng) y se completó con el agua libre de nucleasas que contiene el kit. El programa de PCR comprendió una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturación a 95 °C por 30 s, hibridación a 57 °C por 30 s, extensión de 72 °C por 1 min y una elongación final de 72 °C por 10 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador.

Para la lectura se usó una cámara de electroforesis horizontal, donde se corrió un gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular de 1 Kb. Para su visualización se utilizó un fotodocumentador, se observó la presencia de fragmentos entre 600 y 700 pb. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Corea y se utilizó BLAST del NCBI (2015) para la comparación de las especies.

Análisis filogenético

Las secuencias fueron alineadas con el programa ClustaW. Los análisis filogenéticos se realizaron empleando el algoritmo de máxima verosimilitud con 500 réplicas (Bootstrap) usando el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Las secuencias de *F. oxysporum* a partir de TEF1 α (No. de acceso JF740824, USA), *F. oxysporum* (No. de acceso KF575348, USA) y *F. oxysporum* (No. de acceso KR869782, México), y *F. fujikuroi* (No. de acceso KJ000438, China) depositadas

en la base de datos del GenBank, fueron seleccionadas para incluirlas como especies de referencia junto con las obtenidas en este estudio. *Penicillium sp.* (No. de acceso DQ645808) se designó como la especie fuera de grupo para la construcción del árbol evolutivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización molecular

Los ensayos de PCR con los marcadores ITS y TEF1 α , asociados a la pudrición basal de la pitahaya, confirmaron la presencia de *Fusarium* en los aislamientos patogénicos. La amplificación de la banda para cada primer utilizado fue la esperada. Para

el primer par de primers ITS1-ITS4 amplificó a 600pb y para los primers TEF 1 α se produjo un fragmento esperado de 700 pb.

En la Cuadro 2 se presentan los aislamientos patogénicos (5M, 6M, 8M, 11M, 15M, 20M y 21M), los resultados de secuenciación confirmaron la presencia de la especie *Fusarium oxysporum* para estos aislamientos. En la caracterización molecular ningún aislamiento correspondió a *F. solani*. El aislamiento 6M correspondió a una especie de *Fusarium* con similitudes filogenéticas a *F. oxysporum*.

Los amplicones obtenidos en las secuencias de ITS y TEF fueron de 695 pb y 890 pb, respectivamente; para TEF se presentó un aislamiento (6M) con características de *Fusarium oxysporum*, sin embargo, su secuencia tuvo porcentaje de similitud por debajo

Cuadro 2. Número de accesión y porcentaje de similitud (según GenBank) de aislamientos de *Fusarium* identificados por secuenciación con los marcadores ITS (espacio interno transcripto) y TEF (Factor de elongación de la traducción), aislados de frutos de pitahaya amarilla afectados con pudrición basal y colectados en zonas productoras de los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda, Boyacá y Cundinamarca, en Colombia. Enero, 2015.

Table 2. Accession number and percentage of similarity (as GenBank) of *Fusarium* isolates identified by sequencing the ITS markers (Internal transcribed space) and TEF1 α (Translation elongation factor) isolated from yellow pitahaya fruit affected by basal rot and collected in growing areas of Valle del Cauca, Risaralda, Boyacá, and Cundinamarca, Colombia. January, 2015.

No.	Resultado ITS	No. accesión	% similitud	Resultado TEF	No. accesión	% similitud
2M	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF998987.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
6M*	<i>Fusarium oxysporum</i>	JX853767.1	99	<i>Fusarium cf oxysporum</i>	HM852047.1	83
7M	<i>Fusarium oxysporum</i>	JN020659.1	97	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
8M*	<i>Fusarium oxysporum</i>	JQ701799.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
9M	<i>Fusarium fujikuroi</i>	KJ000438.1	96	<i>Fusarium sacchari</i>	JF740709.1	99
10M	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF718260.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
11M*	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF718260.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
12M	<i>Fusarium fujikuroi</i>	KJ000438.1	99	<i>Fusarium sacchari</i>	JF740709.1	99
13M	<i>Fusarium oxysporum fs cumini</i>	HQ443247.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
14M	<i>Fusarium oxysporum</i>	JN020659.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
15M*	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF718260.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
16M	<i>Fusarium oxysporum fs cumini</i>	KF718260.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
17M	<i>Giberella intermedia</i>	HQ443247.1	99	<i>Fusarium fujikuroi</i>	HF679028.1	99
18M	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF718260.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
20M*	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF718260.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
21M*	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF718260.1	99	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF740724.1	99
22M	<i>Fusarium fujikuroi</i>	HQ443247.1	95	<i>Fusarium sacchari</i>	JF740709.1	99

*Aislamientos patogénicos / pathogenic isolates.

(86%) con respecto a los demás aislamientos evaluados. Para cada aislamiento de *Fusarium* se muestra en el Cuadro 2 el número de accesión y los porcentajes de similitud para ITS y para TEF.

En Colombia, en el cultivo de pitahaya amarilla se han registrado veinticuatro hongos como causantes de enfermedades; sin embargo, en el fruto se destaca la presencia de *Fusarium* spp. y de *Colletotrichum* spp. (Murcia et al., 2013). Mediante identificación morfológica se registró a *F. oxysporum* como el causante de la pudrición basal de la pitahaya en el Valle del Cauca (Varón, 2006). Estudios realizados por Wiwik et al. (2013), demostraron que plantas relacionadas con la familia cactaceae son susceptibles al ataque de *Fusarium*, originando pudriciones blandas y secas que se extienden desde la base del tallo hasta deteriorar la calidad del fruto.

En ese sentido, existe una estrecha relación filogenética entre los aislamientos patogénicos asociados con *F. oxysporum* encontrados en los frutos de pitahaya; siendo esta especie una de las más frecuentemente encontradas en diversidad de cultivos. En cactáceas se ha encontrado asociado a enfermedades como la pudrición basal del tallo de *Hylocereus trigonus* (Choi et al., 2007), pudrición de raíces en *Hylocereus undatus* (Wright et al., 2007), marchitamiento y pudrición de raíz y tallo en *Schlumbergera truncata* (Lops et al., 2013).

Los resultados encontrados en este estudio señalaron una consistencia en el concepto filogenético, debido a que los aislamientos patogénicos presentaron secuencias muy similares a las que registra el GenBank como *F. oxysporum*. La fuente de variabilidad para esta especie que no se reproduce sexualmente o sin identificación del teleomorfo, podría estar asociada a mutaciones, fenómeno que facilita la presencia de elementos transposones y la transferencia genética vía anastomosis de hifas; por lo tanto, se espera que debido a la reproducción asexual del hongo, se establezcan líneas clonales dentro de la población (Jacobson y Gordon, 1991; Kistler, 1997).

Análisis filogenético

Las secuencias con alto porcentaje de identidad (superiores al 83%) fueron analizadas utilizando el coeficiente de máxima verosimilitud, obteniendo agrupamientos similares, tanto para espacio interno

transcrito (ITS), como para el factor de elongación de la traducción (TEF1 α). El análisis filogenético para los aislamientos patogénicos agrupó a *F. oxysporum* en un solo brazo (Figuras 1 y 2) con distancias mínimas entre sus especies.

En esta investigación se utilizó un cebador específico para *Fusarium* altamente informativo a nivel de especie (TEF1 α), debido al alto nivel de secuencias polimórficas que muestran entre especies estrechamente relacionadas; ya que codifica una parte esencial de las proteínas que hacen parte de la maquinaria de traducción (O'Donnell et al., 1998; Geiser et al., 2004). Por lo tanto, puede afirmarse que la información encontrada permitió determinar que las secuencias correspondientes a *F. oxysporum* fueron homólogas con alto grado de similitud y que la distancia encontrada agrupó a las secuencias en una sola especie. Empero que varios autores han señalado la confusión genética del género *Fusarium* dentro del complejo de *F. oxysporum* (O'Donnell et al., 2004; Leslie y Summerell, 2006; O'Donnell et al., 2008; Balajee et al., 2009; Geisser et al., 2013). Esto explica el hecho de que todos los aislamientos que pertenecen a un mismo complejo de especies de *F. oxysporum*, pueden presentar grandes diferencias genéticas derivado de un origen filogenético diferente (Nelson et al., 1994; Leslie y Summerell 2006; O'Donnell et al., 2008; Balajee et al., 2009). Es posible que algunos o varios de los aislamientos del complejo de especies *F. oxysporum* obtenidos en este estudio provinieran de linajes diferentes.

En este estudio se demostró la presencia de una especie que se puede comparar con *F. oxysporum*, la cual correspondió a los aislamientos patogénicos, aún sin registrar en el GenBank (TEF 6 *F. cf. oxysporum* (6M)) ya que en el árbol filogenético se apreciaron diferentes brazos correspondientes a *F. oxysporum*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi* y TEF 6 *F. cf. oxysporum*; el cual con el primer ITS lo ubicó como *F. oxysporum* y TEF 1 α como una especie con características de *F. oxysporum*, pero se encontró alejada del grupo. El primer ITS mostró secuencias muy cercanas entre *F. oxysporum* y no agrupó las especies en grupos diferentes, como se observó con TEF1 α .

Los diferentes brazos del árbol filogenético mostraron una amplia similitud dentro del grupo, especialmente para el grupo de aislamientos patogénicos, lo que indicó que la mayoría provenían

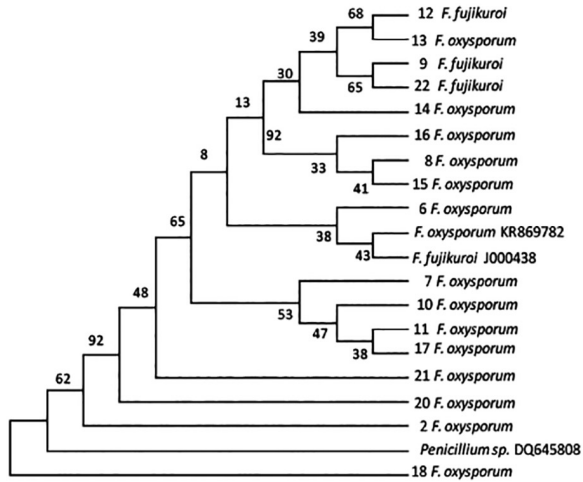


Figura 1. Árbol filogenético de las secuencias de *Fusarium* con el primer ITS (espacio interno transcrito) usando el coeficiente de similitud máxima verosimilitud. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. Enero, 2015.

Figure 1. Phylogenetic tree of the sequences of *Fusarium* with the primer ITS (internal transcribed space) using the coefficient of maximum likelihood. National University of Colombia in Palmira. January, 2015.

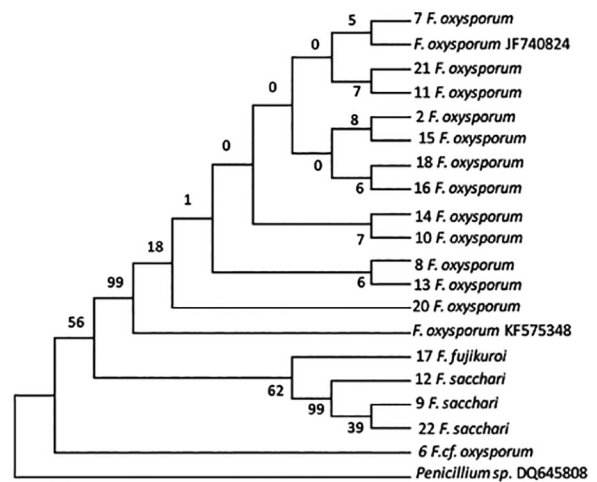


Figura 2. Árbol filogenético de las secuencias de *Fusarium* con el primer TEF 1α (factor de elongación de la traducción), usando el coeficiente de máxima verosimilitud. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira, Enero, 2015.

Figure 2. Phylogenetic tree of the sequences of *Fusarium* with the primer TEF 1α (translation elongation factor), using the coefficient of maximum likelihood. National University of Colombia in Palmira. January, 2015.

de un ancestro común, esto debido a la homología de sus secuencias (Geisser et al., 2013). La alta diversidad del genoma de *F. oxysporum* se debió a elementos transposones que actúan como generadores de la diversidad, ya que su actividad produce mutaciones espontáneas y por consiguiente, variabilidad en el genoma (Daboussi y Langin, 1992; McDonald, 1993). Se cree que el elemento transposon Fot1 es el causante de esa diversidad (Edel et al., 2001).

La metodología usada en este estudio provee un camino práctico para la detección de *Fusarium*, a futuro se esperarían realizar estudios detallados que permitan conocer la distribución de la población del hongo causante de la pudrición basal de la pitahaya, en las diferentes zonas productoras en Colombia.

Por métodos moleculares se logró determinar que el agente causal de la pudrición basal de la pitahaya amarilla fue el hongo *Fusarium oxysporum*, la correspondencia de la especie encontrada en la secuenciación y el análisis filogenético de los dos marcadores caracterizados verifican la información.

La presencia de un aislamiento patogénico con características taxonómicas aún no bien definidas conlleva a pensar que se trata de una especie nueva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la convocatoria Hermes 2013 de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación de este proyecto.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Plant pathology. 5th ed. University of Florida, FL, USA.
- Alves-Santos, F.M., L. Cordeiro-Rodrigues, J.M. Sayagues, R. Martín-Domínguez, P. García-Benavides, M.C. Crespo, M. Díaz-Mínguez, and A.P. Eslava. 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and

- Greece. *Plant Pathol.* 51:605-611. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00745.x
- Arciniegas-León, P.A., J. Torres-Cleves, y A. Abrajim-Pérez. 2014. Estudio de factibilidad para la exportación de pitahaya amarilla al mercado de Japón, como uno de los países líderes de la cuenca del Pacífico. Tesis de grado. Universidad del Rosario, Bogotá, COL.
- Balajee, S., A. Borman, M. Brandt, J. Cano, M. Cuenca-Estrella, and E. Dannaoui. 2009. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and mucorales species in the clinical mycology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 47:877-884.
- Barthana, D., and N. Nasir. 2013. Description of symptoms and disease severity of yellow disease stem rot of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*, L.) in Padang Pariaman, West Sumatera. *J. Bio. UA.* 2:222-228.
- Biblikiowicz, A., y S.M. Hernández. 1998. Organismos Fungosos presentes en las estructuras reproductivas de la pitahaya amarilla. Trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fé de Bogotá, COL.
- Boyd, L., C. Ridout, D. O'Sullivan, J. Leach, and H. Leung. 2013. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agricultura. *Trends Genet.* 29:233-240. doi:10.1016/j.tig.2012.10.011
- Castillo, R., M. Livera, y G. Márquez. 2005. Caracterización morfológica y compatibilidad sexual de cinco genotipos de pitahaya (*Hylocereus undatus*). *Agrociencia* 39:183-194.
- Choi, H.W., I.M. Chung, M.H. Sin, Y.S. Kim, J.B. Sim, J.W. Kim, and S.C. Chun. 2007. The effect of spent mushroom sawdust compost mixes, calcium cyanamide and solarization on basal stem rot of the cactus *Hylocereus trigonus* caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Prot.* 26: 162-168. doi:10.1016/j.cropro.2006.04.017
- Creucí, M., F. Otálvaro-Tamayo, J.E. Muñoz, J.G. Morales, R.S. Suárez, C. Sandoval, M.A. Martínez, D. Cañar, R. Peña, É. Parra, E. Muñoz, R. Rojas, J. Jiménez, A. Benavides, y L.F. Pérez. 2011. Enfoque multidisciplinario para solución en el agro colombiano: el caso pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus*. *Rev. Asoc. Col. Cienc. Biol.* 23:52-64.
- Daboussi, M.J., T. Langin, and Y. Brygoo. 1992. Fot1, a new family of fungal transposable elements. *Mol. Gen. Genet.* 232: 12-16. doi:10.1007/BF00299131
- Delgado-Millán, J.A. 2012. Análisis general de mercado de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*), con fines de su comercialización en la República Popular China (RPC). Tesis de grado, Universidad Autónoma de Occidente, COL.
- Edel, V., N. Steinberg, G. Gautheron, C. Recorbet, and C. Alabouvette. 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:61-71. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010
- Geiser, D., T. Aoki, C.W. Bacon, S.E. Baker, M.K. Bhattacharyya, M.E. Brandt, D.W. Brown, L.W. Burgess, S. Chulze, J.J. Coleman, J.C. Correll, S.F. Covert, P.W. Crous, C.A. Cuomo, G. Sybren-De Hoog, A. Di Pietro, W.H. Elmer, L. Epstein, R.J.N. Frandsen, S. Freeman, T. Gagkaeva, A.E. Glenn, T.R. Gordon, N.F. Gregory, K.E. Hammond-Kosack, L.E. Hanson, M. Jiménez-Gasco, S. Kang, H. Corby-Kistler, G.A. Kuldau, J. Leslie, A. Logrieco, G. Lu, E. Lysøe, L. Ma, S.P. McCormick, Q. Migheli, A. Moretti, F. Munaut, K. O'Donnell, L. Pfenning, R.C. Ploetz, R.H. Proctor, S.A. Rehner, V.A.R.G. Robert, A.P. Rooney, B. Salleh, M. Scandiani, J. Scauflaire, D.P.G. Short, E. Steenkamp, H. Suga, B. A. Summerell, D.A. Sutton, U. Thrane, F. Trail, A. Van Diepeningen, H.D. VanEtten, A. Viljoen, C. Waalwijk, T.J. Ward, M.J. Wingfield, J. Xu, X. Yang, T. Yli-Mattila, and N. Zhang. 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathol.* 103:400-408. doi:10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE
- Geiser, D., M. Jiménez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, J. Ward, and K. O'Donnell. 2004. *FUSARIUM-ID* v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 473-479. DOI: 10.1007/978-1-4020-2285-2_2
- Gómez, E. 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Tesis PhD., Universidad Politécnica de Valencia, ESP.
- Jacobson, D., and T. Gordon. 1991. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: a case study of diversity within a *formae specialis*. *Phytopathol.* 81:1064-1067.
- Kistler, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87: 474-479.
- Kondo, T., M. Martínez, J.A. Medina, A. Rebolledo, C. Cardozo, J.M. Toro, A. Durán, N. Labrador, E.M. Quintero, K. Imbachí, A. Delgado, M.B. Manrique, N. Murcia, A. Rojas-Triviño, M.L. Orozco, y D. Muñoz. 2013. Manual técnico: Tecnologías para el manejo

- de pitaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Palmira, COL.
- Leslie, J., and B. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, London, GBR.
- Lops, F., F. Cibelli, M. L. Raimondo, and A. Carlucci. 2013. First report of stem wilt and root rot of *Schlumbergera truncata* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Opuntiarum* in Southern Italy. *Plant Dis.* 97:846-848. doi:10.1094/PDIS-11-12-1092-PDN
- Mcdonald, J. 1993. Evolution and consequences of transposable elements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:855-864.
- Murcia, N., A. Rojas, M. Orozco, N. Labrador, y J. Medina. 2013. Enfermedades limitantes en el cultivo de pitaya amarilla. En: T. Kondo et al., editores, Manual técnico: tecnología para el manejo de pitaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran en Colombia. Palmira, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica, Palmira, Valle del Cauca, COL. p. 78-87.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2015. Nucleotide. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed mar. 2015).
- Nelson, P., M. Dignani, and E. Anaissie. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:479-504. doi:10.1111/j.1470-9465.2004.00845.x
- O'Donnell, K., H. Kistler, E. Cigelnik, and R. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95:2044-2049.
- O'Donnell, K., D. Sutton, A. Fothergill, D. McCarthy, M. Rinaldi, and M. Brandt. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clin. Microbiol.* 46:2477-2490. doi:10.1128/JCM.02371-07
- O'Donnell, K., D. Sutton, M. Rinaldi, K. Magnon, P. Cox, S. Revankar, S. Sanche, D. Geiser, J. Juba, J. Burik, A. Padhye, E. Anaissie, A. Francesconi, T. Walsh, and J. Robinson. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage. *J. Clin. Microbiol.* 42:5109-5120. doi:10.1128/JCM.42.11.5109-5120.
- Pimentel, D., R. Zuñiga, and D. Morrison. 2005. Update on the environmental and economic cost associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econ.* 52:273-288
- Rojas, A., A. Rebolledo, D. Kondo, J. Toro, y M. Orozco. 2008. Pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). Plegable divulgativo. Centro de Investigación Palmira, Palmira, Valle del Cauca, COL.
- Suárez, R. 2011. Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt & Rose. Tesis MSc., Universidad Nacional de Colombia, Palmira, COL.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Valencia-Botín, A., and K. Hirota. 2013. A brief overview on pitahaya (*Hylocereus* spp.) diseases. *Australas. Plant Pathol.* 42:437-440. doi:10.1007/s13313-012-0193-8
- Varón, F. 2006. Enfermedades de la pitahaya y su manejo. *Rev. Asiava* 73:19-21.
- White, T., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis et al., editors, PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, London, GBR. p. 315-322.
- Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols Mol. Biol.* doi:10.1002/0471142727.mb0204s56
- Wiwik, S., N. Dewa, S. Made, and I. Made. 2013. First report on *Fusarium solani*, a pathogenic fungus causing stem rot disease on dragon fruits (*Hylocereus* sp.) in Bali. *J. Biol. Agric. Healthcare* 3:93-99.
- Wright, E.R., M.C. Rivera, A. Ghirlanda, and G.A. Lori. 2007. Basal rot of *Hylocereus undatus* caused by *Fusarium oxysporum* in Buenos Aires, Argentina. *Plant Dis.* 91:323-327. doi:10.1094/PDIS-91-3-0323A
- Wulff, E.G., J.L. Sørensen, M. Lubeck, K.F. Nielsen, U. Thrane, and J. Torp. 2010. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environ. Microbiol.* 12:649-657. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02105.x