

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Caracterización de Hongos Fitopatógenos de Pitahaya Amarilla
(*Selenicereus megalanthus* Haw.) en Morona Santiago - Ecuador**

Laura Aguado García

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Caracterización de Hongos Fitopatógenos de Pitahaya Amarilla
(*Selenicereus megalanthus* Haw.) en Morona Santiago - Ecuador**

Laura Aguado García

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León Reyes, PhD.

Quito, 18 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Laura Aguado García

Código: 00212318

Cédula de identidad: 1758074403

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.) es nativa de América del Sur y Mesoamérica, y es considerada como alimento funcional y nutracéutico, por lo que ha ganado popularidad en los últimos años, aumentando su demanda y necesidad de producción. El ecotipo “Palora” de Morona Santiago, Ecuador, cuenta con denominación de origen y es extensamente cultivado, generando altos ingresos anuales para el país. Sin embargo, los frutos se ven afectados por enfermedades fúngicas que reducen la calidad y, por lo tanto, su valor comercial, especialmente por los procesos de cosecha y postcosecha. Por esto, el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en frutos de pitahaya amarilla (*S. megalanthus* Haw.). Para ello, se realizó la recolección de muestras de frutas de pitahaya amarilla con sintomatología en cinco localidades, donde se pudo evidenciar una diferencia en el avance de sintomatología debido a los procesos de cosecha y postcosecha al comparar el sitio de producción con los mercados que distribuyen la fruta. Se obtuvieron 30 aislados fúngicos totales que fueron probadas en bioensayos para determinar su patogenicidad. Se encontraron cuatro hongos que causaron infección fitopatógena en los frutos. El aislado M3D1 fue identificado como *Fusarium subglutinans*, y los aislados M1F1, M3G y PAP-1 se agruparon en un mismo clado dentro del complejo de *Fusarium oxysporum* FOOSC. Este trabajo es de importancia debido a que se encontró la presencia de especies del género *Fusarium*, el hongo causante de la enfermedad más limitante de la pitahaya amarilla, demostrando la importancia del diagnóstico y el desarrollo de medidas de prevención y control de estos patógenos.

Palabras clave: *Selenicereus megalanthus* Haw., *Fusarium subglutinans*, *Fusarium oxysporum*, hongos fitopatógenos, pruebas de patogenicidad, análisis filogenético.

ABSTRACT

Yellow dragon fruit (*Selenicereus megalanthus* Haw.) is native of South America and Mesoamerica, and is considered as a functional and nutraceutical food, gaining popularity in recent years and increasing its demand and need of production. The “Palora” ecotype from Morona Santiago, Ecuador, has a denomination of origin and is widely cultivated, generating high annual income for the country. However, the fruits are affected by fungal diseases that reduce the quality and, therefore, the commercial value of the fruits, specially due to harvest and postharvest processes. Therefore, the objective of this study was to isolate and identify phytopathogenic fungi causing diseases in yellow dragon fruit fruits (*S. megalanthus* Haw.). For this purpose, samples of yellow pitahaya fruits with symptomatology were collected in five localities, where a difference in the advance of symptomatology due to the harvest and postharvest processes was evident when comparing the production site with the markets that distribute the fruit. 30 total isolates were obtained and teste in bioassays to determine their pathogenicity. Four fungi were found that caused phytopathogenic infection on fruit. Isolate M3D1 was identified as *Fusarium subglutinans*, and isolates M1F1, M3G and PAP-1 were grouped in the same clade within the *Fusarium oxysporum* FOOSC complex. This study is important because the presence of species of the *Fusarium* genus was found, the causal agent of the most limiting disease of yellow dragon fruit, demonstrating the importance of diagnosis and the development of prevention and control measures for the crop.

Key words: *Selenicereus megalanthus* Haw., *Fusarium subglutinans*, *Fusarium oxysporum*, phytopathogenic fungi, pathogenicity tests, phylogenetic analysis.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
MÉTODOS	15
Recolección de muestras de pitahaya amarilla	15
Obtención de aislamientos puros de hongos de frutos con sintomatología	15
Bioensayos para comprobar patogenicidad de aislados puros	16
Identificación macroscópica y microscópica de los hongos fitopatógenos	16
Identificación de hongos fitopatógenos con herramientas de ADN	16
Análisis filogenético de los hongos fitopatógenos aislados.....	17
RESULTADOS.....	18
Obtención de aislamientos puros de hongos de frutos con sintomatología	18
Bioensayos para comprobar patogenicidad de aislados puros	18
Identificación macroscópica y microscópica de los hongos fitopatógenos	18
Identificación de hongos fitopatógenos con herramientas de ADN	19
Análisis filogenético de los hongos fitopatógenos aislados.....	19
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	25
TABLAS	26
FIGURAS	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers y parámetros de PCR para detección de hongos fitopatógenos.....	26
Tabla 2. Master Mix de PCR para la identificación de hongos fitopatógenos.....	26
Tabla 3. Comparación en BLAST de las secuencias del gen TEF-1 α de los aislados.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Identificación preliminar de los 30 aislados obtenidos de frutos de pitahaya amarilla con sintomatología fúngica.....	27
Figura 2. Aislado M3D1 identificado como <i>Fusarium subglutinans</i>	28
Figura 3. Aislados M1F1, M3G y PAP-1 (de arriba hacia abajo) identificados dentro del complejo de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOSC)	29
Figura 4. Árbol filogenético obtenido del análisis bayesiano de las secuencias del marcador TEF-1 α (Translation Elongation Factor) de 104 cepas pertenecientes al género <i>Fusarium</i> ...	30
Figura 5. Árbol filogenético obtenido del análisis bayesiano de las secuencias del marcador TEF-1 α (Translation Elongation Factor) de 100 cepas pertenecientes al complejo de <i>Fusarium oxysporum</i> (FOSC).....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación Medio V8 y CZAPEK.....	37
--	----

INTRODUCCIÓN

La pitahaya, comúnmente conocida como la “fruta del dragón”, es una fruta perteneciente a la familia Cactaceae que deleita la vista de sus consumidores por su apariencia exótica. A nivel mundial se cultivan diversas variedades distribuidas especialmente en Asia y América, las cuales pueden ser diferenciadas por la llamativa forma y gama de colores que poseen tanto en su corteza escamosa como en su pulpa (Verona-Ruiz et al., 2020). Las especies más cultivadas son *Hylocereus undatus* de cáscara roja con escamas verdes y pulpa blanca, *H. monacanthus* de cáscara roja y pulpa violeta/rojiza, *H. costaricensis* de cáscara roja intensa y pulpa rojiza, y *Selenicereus megalanthus* de cáscara amarilla y pulpa blanca (Balendres & Bengoa, 2019).

La pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.) es nativa de la zona norte de América del Sur y Mesoamérica, encontrándose en países como México, Nicaragua, Colombia y Ecuador, por lo que es capaz de crecer entre 500 y 1900 msnm a una temperatura de entre 18 y 25°C y humedad relativa entre 70% y 80% (Vásquez-Castillo et al., 2016). La planta se caracteriza por ser perenne, epífita y trepadora, con flores en forma de campana de color verde en su exterior y blanco en el interior. Por otro lado, la fruta tiene una forma elipsoidal, cuya corteza amarilla posee formaciones sobresalientes conocidas como bractéolos cerosos de los cuales sobresalen espinas (Sotomayor et al., 2019; Verona-Ruiz et al., 2020).

Además, esta fruta es considerada un alimento funcional y nutracéutico, que posee vitamina C, fibra, agua hasta en un 80%. Tiene propiedades antioxidantes y laxantes debido a que sus semillas permiten aliviar problemas estomacales y del tracto digestivo. Así mismo, su consumo ayuda al mantenimiento óseo y sanguíneo (Erazo-Lara et al., 2024; Vargas et al., 2020). Debido a esto, la pitahaya amarilla ha ganado popularidad en los últimos años, lo que ha aumentado su demanda y, por lo tanto, la necesidad de su producción (Erazo-Lara et al., 2024).

En Ecuador, se cultivan dos ecotipos de pitahaya amarilla: el ecotipo “Pichincha”, también conocido como “Nacional”, el cual se cultiva en el noroccidente de la provincia de Pichincha, y sus frutos pueden alcanzar un peso de hasta 150 g, y por otro lado, el ecotipo “Palora”, que se produce extensamente en Palora, Morona Santiago, y sus frutos llegan a pesar hasta 350 g (Erazo-Lara et al., 2024; Sotomayor et al., 2019).

El ecotipo “Palora” cuenta con denominación de origen como Pitahaya Amazónica de Palora desde el 2018, convirtiéndose en el quinto producto del Ecuador con esta mención otorgada por el Servicio Nacional de Derechos Intelectuales (SENADI), lo que permite que los productores tengan apoyo y protección en el cultivo de esta fruta, garantizando a los consumidores la calidad del producto (Vargas et al., 2020). Como se mencionó anteriormente, este ecotipo es extensamente cultivada en el cantón Palora, provincia Morona Santiago, representando el 97,85% de la producción nacional de esta fruta, con una producción anual superior a las 25 mil toneladas (Erazo-Lara et al., 2024; Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2024). Por otro lado, según datos del Banco Central del Ecuador (BCE), en el 2022 el país exportó más de 23 mil toneladas, las cuales representaron más de 99 millones de dólares para el país (Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, 2023). Para el 2023, el BCE registró un aumento del 72% de estas cifras con respecto a 2022, registrando aproximadamente 54 mil toneladas que representaron 172 millones de dólares en exportaciones (Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, 2024). Finalmente, entre enero y agosto del 2024, se han registrado 50 mil toneladas exportadas, alcanzando un valor de 383 millones de dólares en pitahaya amarilla (Fluctuante, 2024).

La alta demanda de esta fruta, tanto a nivel nacional como internacional, hace que sea necesario tener protocolos de producción adecuados para asegurar la calidad del fruto, especialmente en el proceso de cosecha y postcosecha. Los frutos de pitahaya amarilla son cosechados de

acuerdo con el mercado al que van dirigidos, siguiendo los grados de maduración de la Norma Técnica Colombiana (NTC-3554). Esto es importante debido a que afecta la calidad organoléptica del fruto y el manejo postcosecha (Vargas et al., 2020).

El proceso inicia con el corte de la fruta y el desespinado, proceso realizado manualmente, el cual es un punto clave debido a que se pueden ocasionar heridas por donde pueden ingresar microorganismos. Posteriormente, se sigue con el transporte a centros postcosecha bajo condiciones que prevengan golpes y daños. Allí se realiza la selección y clasificación de acuerdo con las características físicas del fruto. Además, se aplica un preenfriamiento para disminuir la maduración y degradación, un lavado y desinfección para mantener inocuidad y calidad, un proceso de secado y, finalmente, un empaque y almacenamiento el cual varía según el destino, ya sea para exportación o para mercado nacional (Vargas et al., 2020). Todo este proceso es necesario realizarse meticulosamente para evitar daños en la fruta, debido a que la vuelven susceptible a enfermedades, especialmente fúngicas, que causan pérdidas significativas de hasta el 75% del cultivo (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2024).

Se conocen 17 géneros y 25 especies de fitopatógenos que originan enfermedades fúngicas desde las flores hasta la penca y fruto de la planta de pitahaya amarilla (Verona-Ruiz et al., 2020). Una de las enfermedades principales de esta fruta y la más limitante para el cultivo es la pudrición basal del fruto causada por especies del género *Fusarium* como *Fusarium oxysporum* sp. *melonis*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium fujikuroi* y *Fusarium solani*. Estos hongos ocasionan variadas alteraciones en la planta que pueden ser evidenciados cerca de la cosecha, como lesiones amarillentas en las pencas y destrucción del sistema radicular total o parcialmente hasta una madurez prematura, así como lesiones necróticas y pudrición seca en un 50% del fruto. Estas afecciones pueden generar pérdidas de hasta el 80% del cultivo (Morillo et al., 2023; Vargas et al., 2020). Además, la pitahaya amarilla puede verse afectada

por hongos necrótrofos que se alimentan de las células muertas de los tejidos dañados. Un ejemplo de este tipo de hongos es *Alternaria alternata*, el cual causa pudrición negra o sarna en esta fruta, generando lesiones protuberantes y manchas de color café a negro polvorientas en el tejido del fruto y que llevan a la pudrición (Morillo et al., 2023; Vargas et al., 2020). Por otra parte, especies del género *Colletotrichum* como *Colletotrichum aenigma*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum karstii* causan la enfermedad antracnosis que se caracteriza por una lesión necrótica y deprimida tanto en el tallo como en el fruto (Morillo et al., 2023).

En general, las enfermedades fúngicas disminuyen significativamente la calidad, lo que afecta el valor comercial de los frutos y, en consecuencia, los ingresos de productores y exportadores. Por esta razón, el diagnóstico de fitopatógenos es de importancia para su prevención y control (Valencia-Chamorro et al., 2016). Debido a esto, el objetivo de este trabajo es aislar e identificar molecularmente hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en frutos de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.). De manera específica, se busca recolectar muestras de pitahaya amarilla en 5 diferentes localidades, obtener cultivos puros de microorganismos de las muestras de frutas que presentan síntomas para ser identificados macroscópicamente y microscópicamente, para después poder realizar bioensayos que permitan determinar la patogenicidad de los aislados puros e identificar con herramientas de ADN los hongos fitopatógenos asociados con enfermedades de la pitahaya amarilla.

MÉTODOS

Recolección de muestras de pitahaya amarilla

Se adquirió los frutos de pitahaya amarilla en 5 localidades: 4 mercados de Quito, Ecuador que distribuyen frutos del ecotipo “Palora”, y 1 sitio de producción de Palora, Morona Santiago, Ecuador (1°42'S 77°56'O). En cada localidad, se seleccionaron 2 frutos con manchas necróticas polvorizadas en la corteza, lo cual se usó como indicativo de síntomas de enfermedad fúngica.

Obtención de aislamientos puros de hongos de frutos con sintomatología

Los frutos recolectados fueron colocados en cámara húmeda (99% de humedad relativa) durante tres días para favorecer el crecimiento de los microorganismos presentes, permitiendo que se desarrollen lo suficiente como para ser visibles, ya que podrían no ser evidentes desde el principio (Herrera-León et al., 2022; Muñoz et al., 2020). Después, se realizaron pases directos del micelio observable sobre los frutos a un medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, DIFCO) con gentamicina (160mg/ml). Por otro lado, se realizó cortes del tejido del fruto con un tamaño de 1x1cm, específicamente de la corteza infectada, con el objetivo de aislar los microorganismos presentes dentro del tejido infectado. Estos tejidos fueron sometidos a un protocolo de desinfección superficial: un lavado en hipoclorito de sodio al 1.5% con una gota de Tween 80, seguido de un lavado en etanol al 70% y tres lavados en agua destilada estéril (Ramírez-Villacis et al., 2023); cada lavado se realizó durante 1 minuto con agitación manual. Después, estos fragmentos se colocaron en medio de cultivo PDA, medio V8 y medio CZAPEK (**Anexo 1**), todos con gentamicina (160mg/ml), y se incubaron a 25°C durante 15 días. Transcurrido el tiempo, se logró observar la formación de colonias algodonosas diversas y estructuras de esporulación. Para obtener aislamientos puros se realizó el pase directo de cada tipo de micelio en 3 medios diferentes (PDA, V8, CZAPEK) con gentamicina, para después incubarlo a 25°C durante 7 días. Con esto, se obtuvo un total de 30 aislados.

Bioensayos para comprobar patogenicidad de aislados puros

Los 30 aislados totales fueron probados en pruebas de patogenicidad (bioensayos). Para ello, se diluyeron las esporas de los hongos con agua destilada estéril con el fin de obtener soluciones de esporas, diluidas hasta una concentración de 10^6 esporas/ml (Ramírez-Villacis et al., 2023). Las frutas seleccionadas para el bioensayo fueron obtenidas del sitio de producción de Palora, Morona Santiago, Ecuador ($1^{\circ}42'S$ $77^{\circ}56'O$). Se caracterizaron por tener una corteza amarilla sin sintomatología, es decir, frutos sanos. Todas las frutas pasaron por un protocolo de desinfección superficial: un lavado en hipoclorito de sodio al 2% por 2 min, un lavado en alcohol al 70% durante 1 min, y dos lavados en agua destilada estéril (Ángel-García et al., 2018). Después, 10 μ l de cada solución de esporas se inocularon en una fruta diferente, con herida y sin herida, las cuales se colocaron en cámara húmeda durante 7 días; las frutas control no tuvieron inoculación. Finalmente, se realizaron los postulados de Koch, en donde se hizo un re-aislamiento de los sitios de inoculación que presentaron sintomatología de enfermedad (Ramírez-Villacis et al., 2023; Riera et al., 2019). Para ello, se siguió el mismo procedimiento de obtención de aislamientos puros de hongos.

Identificación macroscópica y microscópica de los hongos fitopatógenos

Se realizó una identificación preliminar macroscópica de la morfología anversa y reversa de los hongos re-aislados, y una identificación preliminar microscópica bajo un microscopio Leica DM750 a 40X y 100X, comparando con literatura (Williams-Woodward, 2001).

Identificación de hongos fitopatógenos con herramientas de ADN

El ADN de los hongos que resultaron positivos como fitopatógenos en los frutos de pitahaya fue extraído con el kit comercial DNeasy® PowerSoil® Pro-Kit de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN, 2023). Después, se realizaron amplificaciones por PCR (Polymerase Chain Reaction) de las regiones ITS (Internal Transcribed Space) y TEF-1 α

(Translation Elongation Factor) con primers específicos (**Tabla 1**) (Ramírez-Villacis et al., 2023). Para todas las reacciones, el Mastermix de PCR tuvo un volumen final de 25 µl (**Tabla 2**). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador (MultiGene™, Labnet) siguiendo parámetros específicos (**Tabla 1**). Como control positivo se usó un ADN del género *Fusarium*, y como control negativo, ADN de bacteria, ambos facilitados por el Laboratorio de Agrobiotecnología de la USFQ. Los productos de PCR fueron visualizados con electroforesis en gel de agarosa al 2% preparado con TAE 1X y tinte SYBR Safe a 100V durante 30 min, usando el TrackIt™ 100 bp DNA Ladder de Invitrogen como referencia, y visualizados con un fotodocumentador (ENDURO™ GDS, Labnet). Finalmente, los productos de PCR fueron enviados a secuenciación en Macrogen (Corea) con el método Sanger, para después realizar un alineamiento con DNA Baser, una comparación con NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), y un análisis filogenético para confirmar especie.

Análisis filogenético de los hongos fitopatógenos

Las secuencias obtenidas de estos hongos se alinearon con secuencias de referencia de la base de datos FUSARIOID-ID (Westerdijk FungalBio, Diversity Institute, The Netherlands), usando ClustalW bajo el software de MEGA11. Se realizó una comparación de diferentes especies de *Fusarium* a partir de la región TEF-1 α . Como outgroups, se utilizaron las especies *Bifusarium dimerum* y *Fusarium sacchari* para construir un árbol filogenético general (con algunos complejos de *Fusarium*) y otro árbol específico (sólo con el complejo de especies de *Fusarium oxysporum* FOOSC), respectivamente. El análisis filogenético se realizó usando el método estadístico de inferencia bayesiana, con un modelo de sustitución GTR+I+G, en el programa BEAST v10.5.0 (Drummond & Rambaut, 2007). MCMC fue corrido con un total de 100000000 generaciones y se muestrearon cada 1000 generaciones. Se realizó un “burn-in” del 1% y finalmente, estos árboles fueron observados y editados utilizando FigTree v1.4.3.

RESULTADOS

Obtención de aislamientos puros de hongos de frutos con sintomatología

Se obtuvo un total de 30 aislados, de los cuales seis provenían del sitio de producción en Palora, Morona Santiago, Ecuador, y los 24 restantes de los cuatro mercados de la ciudad de Quito, Ecuador. La identificación macroscópica preliminar de todos estos aislados determinó posibles hongos de los géneros *Fusarium* sp., *Clonostachys* sp., *Alternaria* sp., *Pythium* sp., *Graphyium* sp., y *Diaporthe* sp. (**Figura 1**).

Bioensayos para comprobar patogenicidad de aislados puros

A partir de los bioensayos realizados con los 30 aislados, se encontraron en total cuatro hongos que causaron infección fitopatógena para la pitahaya amarilla debido a que evidenciaron sintomatología como necrosis, hundimiento del tejido y crecimiento de micelio. De estos cuatro aislados, tres pertenecen a los sitios de mercados, donde se identificaron como aislado M3D1, aislado M1F1 y aislado M3G, y el cuarto aislado restante pertenece al sitio de producción de Palora, identificado como aislado PAP-1.

Identificación macroscópica y microscópica de los hongos fitopatógenos

Se realizó una caracterización macroscópica y microscópica de los cuatro hongos que causaron lesiones en los frutos. El hongo M3D1 (**Figura 2**) se caracterizó por tener micelio blanquecino/morado y una coloración amarilla en su reverso. Microscópicamente, se observaron macroconidias alargadas y septadas, al igual que microconidias ovoides. Por otro lado, el hongo M1F1 (**Figura 3.a-c**) se caracterizó por tener micelio blanquecino en la parte superior y tener una coloración blanquecina/amarillenta en el reverso. En la visualización microscópica se observaron microconidias ovoides, y macroconidios septados y alargados. El hongo M3G (**Figura 3.d-f**) se caracterizó por tener micelio blanquecino que se tornaba morado

y una coloración morada en su reverso. Microscópicamente, se observaron microconidios ovoides, y monofálides simples con falsas cabezas. Finalmente, el hongo PAP-1, presentó características macroscópicas como micelio aéreo blanquecino que se tornaba púrpura y un reverso de color anaranjado. Microscópicamente, fue posible identificar macroconidias alargadas (**Figura 3.g-i**). Todos los aislados presentaron características pertenecientes al género *Fusarium*.

Identificación de hongos fitopatógenos mediante herramientas de ADN

A partir de la amplificación por PCR de las regiones ITS y TEF-1 α , se obtuvo una única banda de tamaños aproximados de 600 bp y 700 bp, respectivamente, para cada uno de los aislados. Después del secuenciamiento, se realizó una comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos de BLAST, en donde el aislado M3D1 tuvo un porcentaje de identidad del 99,26% con la especie *Fusarium subglutinans* y los aislados M1F1, M3G y PAP-1 tuvieron un porcentaje de identidad de 99,85%, 100% y 99,86% con la especie *Fusarium oxysporum*, respectivamente (**Tabla 3**).

Análisis filogenético de los hongos fitopatógenos

Se realizaron dos árboles filogenéticos usando la región TEF-1 α para confirmar la especie de los aislados. El primer árbol filogenético fue un árbol general en donde se usó especies de diferentes complejos del género *Fusarium*, en donde se demostró que el aislado M3D1 se agrupó dentro del clado de *F. subglutinans* en el complejo de especies de *F. fujikuroi* (FFSC), con un posterior de 1, indicando una alta confiabilidad de la formación de este clado, y los aislados M1F1, M3G y PAP-1 se agruparon en un mismo clado, con un posterior de 1, cercano al clado de *Fusarium oxysporum* dentro del complejo de especies de *F. oxysporum* (FOSC) (**Figura 4**). Debido a que no se pudo resolver la especie de estos tres aislados, se realizó un segundo árbol más específico, usando solo las especies pertenecientes al complejo FOSC. En

este árbol se confirmó que los aislados M1F1, M3G y PAP-1 están relacionados entre sí, formando un clado con un posterior de 0.73. Sin embargo, no hay una relación con otra especie ya reportada, la más cercana es la especie de *Fusarium veterinarium*, que se encuentra en un clado cercano, con un posterior de 0.99 (**Figura 5**).

DISCUSIÓN

Debido a que la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.) es una fruta de alta producción e importancia en el marco económico a nivel mundial (Erazo-Lara et al., 2024), es necesario controlar las enfermedades que la atacan. El cantón Palora, en Morona Santiago, es la localidad principal de producción de esta fruta en Ecuador, donde existen periodos de humedad que oscilan entre el 40% y 90% y altas temperaturas desde 18°C hasta 29°C (Diebel & Norda, 2024). Si bien son condiciones óptimas para el cultivo de esta fruta, estudios han determinado que las variables climáticas más importantes para predecir los brotes de enfermedades fúngicas en plantas son la humedad y la temperatura (Romero et al., 2021). De esta manera, se evidencia que el clima en Palora puede potenciar la distribución de hongos potencialmente patógenos en estos cultivos.

Por otro lado, la pitahaya amarilla tiene una corta vida postcosecha debido a la alta respiración y deshidratación, lo que la hace susceptible a enfermedades fúngicas complejas que causan lesiones en los tejidos del fruto en los procesos de cosecha y postcosecha, generando hundimiento en los tejidos y manchas necróticas polvorientas (Vilaplana et al., 2018). Además, la presencia de estas enfermedades empeora la durabilidad en el almacenamiento en percha (Balendres & Bengoa, 2019). Esto se comprobó cuando se observó una diferencia en el avance de la sintomatología al comparar los frutos del sitio de producción con los de los mercados.

En este estudio, fue posible obtener 30 aislados de hongos (**Figura 1**), a partir de 10 frutos de pitahaya amarilla con presencia de sintomatología, recolectados en los cinco sitios diferentes, lo que indica una amplia diversidad favorecida por las condiciones climáticas del cultivo y por los procesos de cosecha y postcosecha. Los géneros identificados de los aislados fueron *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., y *Diaporthe* sp., los cuales, de acuerdo con literatura, ocasionan diversas lesiones tanto en fruta como en penca y raíces, lo que disminuye

significativamente el rendimiento del cultivo y, por lo tanto, causa pérdidas económicas y un problema potencial para la seguridad alimenticia (Balendres & Bengoa, 2019; Rogério, 2022).

Por otra parte, en general, las pruebas de patogenicidad permiten visualizar el nivel de daño que causan los hongos fitopatógenos, de acuerdo con la aparición de sintomatología anormal en la planta (Venbrux et al., 2023). Los bioensayos realizados en este estudio confirmaron la patogenicidad de cuatro aislados M3D1, M1F1, M3G y PAP-1, debido a que causaron lesiones en los sitios de inoculación del fruto sano, mostrando sintomatología de enfermedad fúngica similar a la observada en campo y percha, es decir, lesiones necróticas, hundimiento del tejido y crecimiento de micelio (Vilaplana et al., 2018).

Estos cuatro aislados fueron identificados macroscópicamente y microscópicamente como *Fusarium* sp. Para llegar a esta identificación morfológica a nivel de género se realizó una observación macroscópica de la producción de pigmentos en el medio de cultivo PDA, y una observación microscópica de conidios, número de septos y sus formas que fueron comparadas con claves taxonómicas (Muñoz et al., 2020; Organización Panamericana de la Salud, 2019).

El primer hongo identificado fue el aislado M3D1 con características macroscópicas como micelio aéreo algodonoso de rápido crecimiento con coloración blanca que se tornaba morada y pigmentación amarilla/morada en su reverso, y características microscópicas como macroconidias fusiformes septadas y microconidias ovoides (**Figura 2**), las cuales coinciden con la literatura reportada para la identificación del género *Fusarium* (Thrane, 2014).

En cuanto a los aislados M1F1, M3G y PAP-1, mostraron características macroscópicas como micelio aéreo algodonoso y pigmentación diferenciada en el reverso, y características microscópicas como la presencia de macroconidias y microconidias (**Figura 3**). Estas características, de igual manera, coinciden con la literatura reportada para la identificación del género *Fusarium* (Thrane, 2014).

Por otra parte, se realizó una identificación a nivel de especie utilizando herramientas de ADN, puesto que, en el caso de *Fusarium*, la morfología no permite discriminar entre especies adecuadamente (Salazar-González et al., 2016). En estudios previos realizados con el fin de caracterizar molecularmente a aislados de *Fusarium* asociados con *S. megalanthus*, se ha reportado el uso de los genes ITS y TEF-1 α (Salazar-González et al., 2016). En la amplificación por PCR de los marcadores ITS y TEF-1 α para los cuatro aislados, se obtuvo una única banda en cada caso de tamaños aproximados de 600bp y 700bp, respectivamente. Esto coincide con la literatura debido a que, para *Fusarium*, se reportan tamaños entre 500bp y 600bp para ITS, y entre 600bp y 700bp para TEF-1 α (Salazar-González et al., 2016; Zarrin et al., 2016).

Posteriormente, se realizaron comparaciones con la base de datos de BLAST y se realizó adicionalmente un análisis filogenético (Zakaria, 2023), ya que los árboles filogenéticos son importantes en el estudio de patógenos de plantas debido a que permiten relacionar el aislado estudiado con especies conocidas y, además, permite estudiar el rango de plantas que pueden ser afectadas y la dispersión y desarrollo del patógeno (Gougherty & Davies, 2021).

Para el aislado M3D1, tanto en BLAST como en el árbol filogenético, se pudo verificar que pertenece a la especie *F. subglutinans*, dentro del complejo de *F. fujikuroi* FFSC (**Tabla 3, Figura 4**), ya que formó un clado con un posterior de 1, lo cual indica que la confianza de la formación de este clado es alta, tomando en cuenta que la filogenia es confiable cuando se tiene un valor de probabilidad >0.5 (Tanner, 2021, Drummond & Rambaut, 2007).

En general, las especies de FFSC se caracterizan por producir fumonisinas, micotoxinas que inducen muerte celular programada en los tejidos, e inhiben enzimas de transformación de compuestos lo cual interfiere con el crecimiento, la diferenciación y comunicación celular, generando malformaciones y pudrición en las frutas (Munkvold, 2017). Esto coincide con la sintomatología observada en los bioensayos del aislado M3D1 (Balendres & Bengoa, 2019).

Por otro lado, los aislados M1F1, M3G y PAP-1 fueron comparados en BLAST con la especie *F. oxysporum* (**Tabla 3**). Sin embargo, al realizar el análisis filogenético, estos hongos se agruparon en clado diferente a la especie *F. oxysporum*, con un posterior de 1 (confirmando que la filogenia obtenida es confiable), dentro del complejo de *F. oxysporum* FOSC. (**Figura 5**) (Tanner, 2021). Por esta razón, se realizó un segundo árbol más específico, solo con secuencias de especies pertenecientes al complejo FOSC, en donde se observó que estos tres aislados se agrupan en un solo clado con un posterior de 0.73, pero no se relacionan a ninguna especie de *Fusarium* reportada. La especie más cercana es *F. veterinarium*; sin embargo, esta especie forma un clado diferente a los aislados con un posterior de 0.99.

Al no haber llegado a nivel de especie de estos tres aislados, se debe realizar identificación molecular con más genes. Para el género *Fusarium* se ha reportado la secuenciación de los genes RPB1 (RNA Polymerase II Largest Subunit) y RPB2 (RNA Polymerase II Second Largest Subunit) para la identificación de especies con bases de datos a nivel internacional (Organización Panamericana de la Salud, 2019; Zakaria, 2023), por lo que es importante aumentar estos marcadores para poder llegar a la identificación de especie en este género.

Finalmente, una amplia cantidad de cultivos de frutas en el mundo se ven afectados por hongos fitopatógenos del género *Fusarium*. En campo, debilitan el crecimiento del cultivo y reducen el rendimiento antes de la cosecha, y en la postcosecha causan enfermedades que afectan la apariencia de los frutos; además, el movimiento de frutos contaminados a mercados nacionales e internacionales fomenta la propagación de hongos fitopatógenos y de las enfermedades que ocasionan (Moreno et al., 2021; Zakaria, 2023). Por ello, es crucial realizar estudios sobre enfermedades persistentes causadas por estos fitopatógenos en cultivos como el de la pitahaya amarilla de Palora para el diagnóstico de las mismas, dando paso a medidas de prevención y control para evitar pérdidas económicas y reducir la amenaza de la producción agrícola y de la seguridad alimenticia (Gai & Wang, 2024; Patel et al., 2022).

CONCLUSIONES

El diagnóstico de enfermedades relacionadas con los frutos de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.) es de alta importancia, debido a que es un cultivo de interés y que se encuentra en constante crecimiento en el marco económico del Ecuador. En este trabajo fue posible evidenciar una diferencia en el avance de la sintomatología de enfermedades fúngicas del sitio de producción y de los mercados debido a los procesos de cosecha y postcosecha. Por otro lado, fue posible encontrar una amplia diversidad de hongos asociados a las lesiones presentes en los frutos. De los 30 aislados se logró identificar cuatro aislados que resultaron como fitopatógenos de la pitahaya amarilla, al generar sintomatología necrótica y hundimiento del tejido de la corteza del fruto. El aislado M3D1 fue identificado como *Fusarium subglutinans* dentro del complejo de *Fusarium fujikuroi* FFSC. Los aislados M1F1, M3G y PAP-1 se agruparon en un mismo clado dentro del complejo de *Fusarium oxysporum* FOOSC. Por esto, se recomienda realizar árboles filogenéticos con más marcadores como RPB1 y RPB2 para identificar de manera específica la especie a la que pertenecen estos aislados. Finalmente, se deberían realizar más estudios para determinar otros hongos fitopatógenos de la pitahaya amarilla y sus mecanismos de infección, con el fin de diagnosticar las enfermedades y desarrollar medidas de prevención y control para evitar pérdidas del cultivo.

TABLAS

Tabla 1. Primers y parámetros de PCR para la identificación de hongos fitopatógenos.

Región	Primer	Secuencia del Primer (5' y 3')	Parámetros	Tamaño gen (bp)	Referencias
Internal Transcribe Sequence (ITS)	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	94°C por 3min; 30 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min, y 72°C por 1min; 72°C por 10min	~600bp	(Yaser & Abass, 2022 ; Zarrin et al., 2016)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
Translation Elongation Factor (TEF-1 α)	EF-1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	95°C por 5min; 35 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min, y 72°C por 2min; 72°C por 10min	~700bp	(Duvkank et al., 2016; Salazar-González et al., 2016)
	EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT			

Tabla 2. Master Mix de PCR para la identificación de hongos fitopatógenos

Reactivo	1X (μ l)
H ₂ O PCR	16.1
Buffer 10X	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	0.5
Primer F (10 pmol)	1.25
Primer R (10 pmol)	1.25
dNTPs (10 mM)	0.5
BSA	1
DMSO	0.5
Platinum® Taq DNA Polymerase de Invitrogen	0.4
TOTAL Master Mix	24
ADN	1
TOTAL REACCIÓN	25

Tabla 3. Comparación en BLAST de las secuencias de los aislados con el marcador TEF-1 α

Código aislado	Nombre científico	Max score	Total score	Query cover	E value	Per. Ident	Accession
M3D1	<i>Fusarium subglutinans</i>	1218	1218	100%	0.0	99,26%	KM213991.1
M1F1	<i>Fusarium oxysporum</i>	1266	1266	99%	0.0	99,85%	KT230849.1
M3G	<i>Fusarium oxysporum</i>	1249	1249	100%	0.0	100%	MK968885.1
PAP-1	<i>Fusarium oxysporum</i>	1282	1282	100%	0.0	99,86%	MN223431.1

FIGURAS

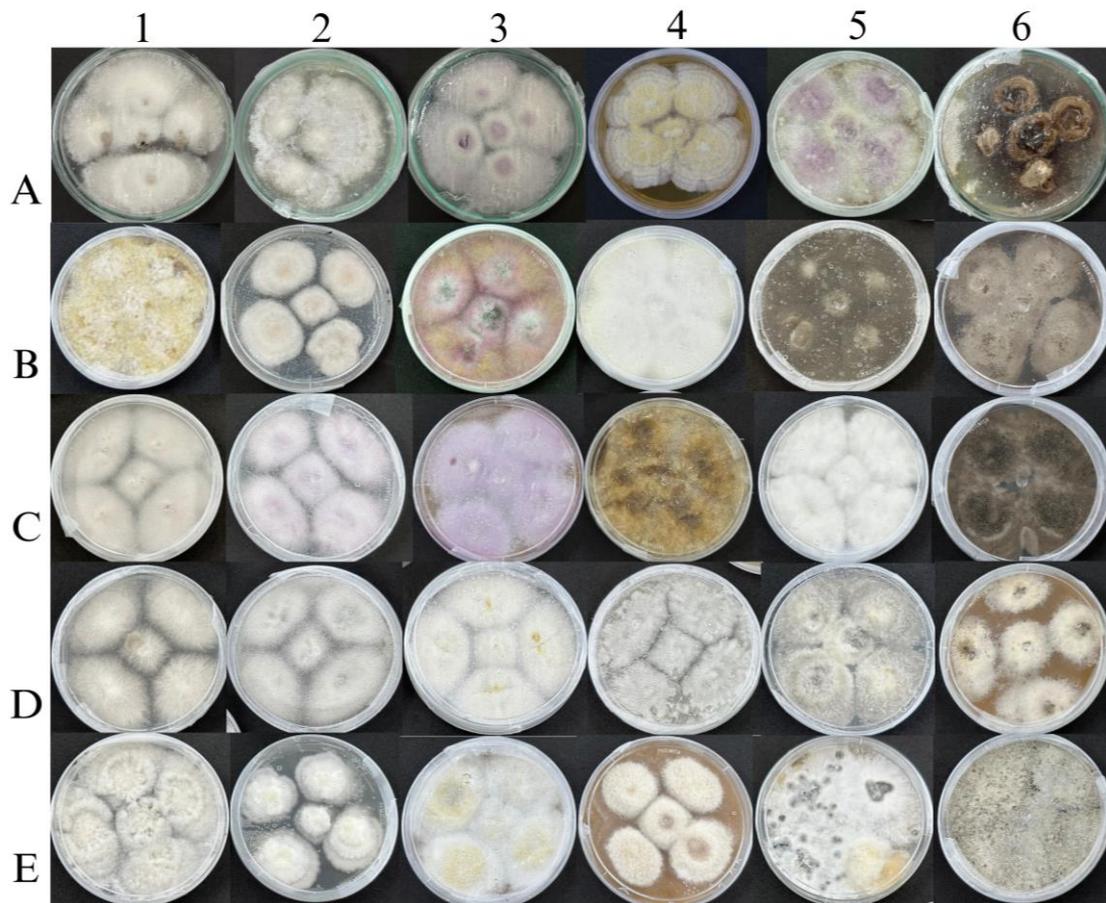


Figura 1. Identificación preliminar de los 30 aislados obtenidos de frutos de pitahaya amarilla con sintomatología fúngica. A) Aislados del sitio de producción: *Fusarium* sp. (1-5), *Alternaria* sp. (6). B) Aislados del mercado 1: *Fusarium* sp. (1-3), *Pythium* sp. (4), *Graphyium* sp. (5), *Alternaria* sp. (6). C) Aislados del mercado 2: *Fusarium* sp. (1-4), *Clonostachys* sp. (5), *Alternaria* sp. (6). D) Aislados del mercado 3: *Fusarium* sp. (1-4), *Clonostachys* sp. (5-6). E) Aislados del mercado 4: *Fusarium* sp. (1-3), *Clonostachys* sp. (4), *Diaporthe* sp. (5-6).

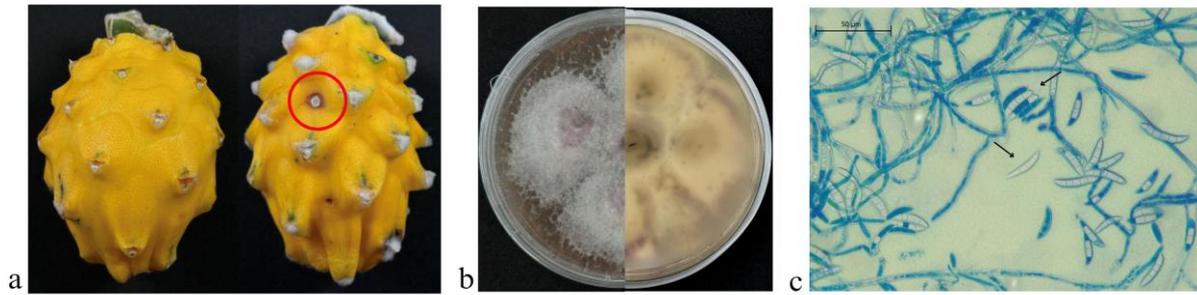


Figura 2. Aislado M3D1 identificado como *Fusarium subglutinans*. a) Fruta sana como control (izquierda) y fruta con el inoculado de esporas de M3D1 (derecha). b) Hongo en PDA después de 14 días a 25°C; superficie (izquierda) y reverso (derecha). c) Macroconidias a 40X.

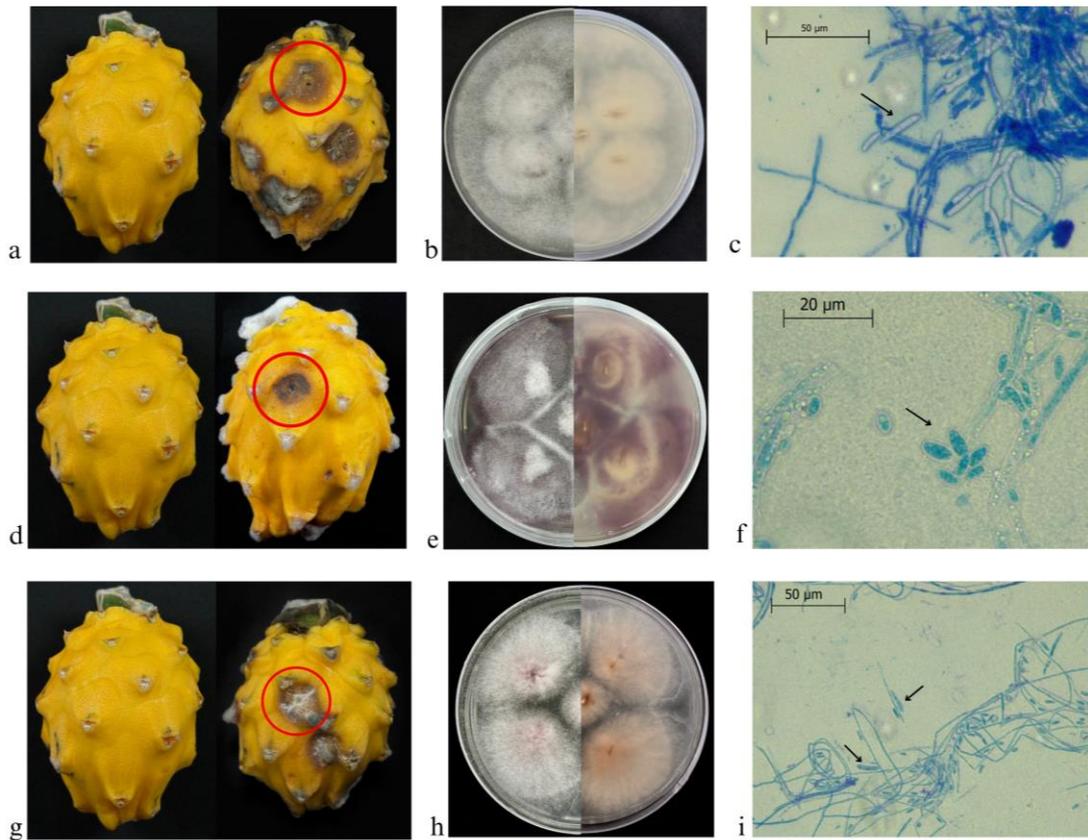


Figura 3. Aislados M1F1, M3G y PAP-1 (de arriba hacia abajo) identificados dentro del complejo de *Fusarium oxysporum* (FOSC). a) Fruta sana como control (izquierda) y fruta con inoculado de esporas de M1F1 (derecha). b) Hongo en medio PDA después de 14 días a 25°C; superficie (izquierda) y reverso (derecha). c) Macroconidias a 40X. d) Fruta sana como control (izquierda) y fruta con inoculado de esporas de M3G (derecha). e) Hongo en medio PDA después de 14 días a 25°C; superficie (izquierda) y reverso (derecha). f) Microconidias a 100X. g) Fruta sana como control (izquierda) y fruta con inoculado de esporas de PAP-1 (derecha). h) Hongo en medio PDA después de 14 días a 25°C; superficie (izquierda) y reverso (derecha). i) Macroconidias a 40X.

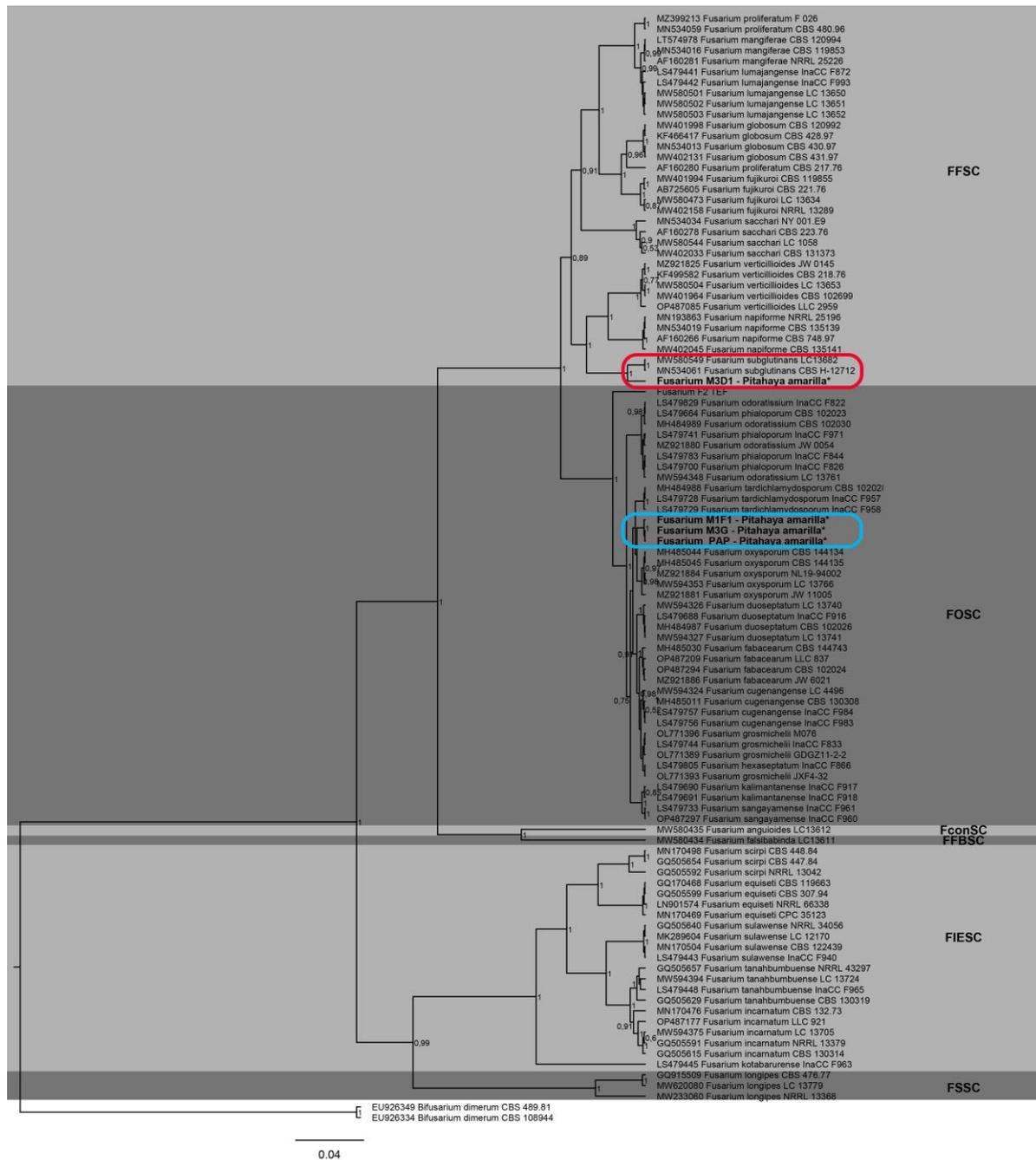


Figura 4. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis bayesiano de las secuencias TEF-1 α (Translation Elongation Factor) de 104 cepas pertenecientes al género *Fusarium*. El valor de los nodos representa la probabilidad posterior bayesiana. *Bifusarium dimerum* se usó como outgroup. La barra de escala indica el número de cambios esperados por sitio.

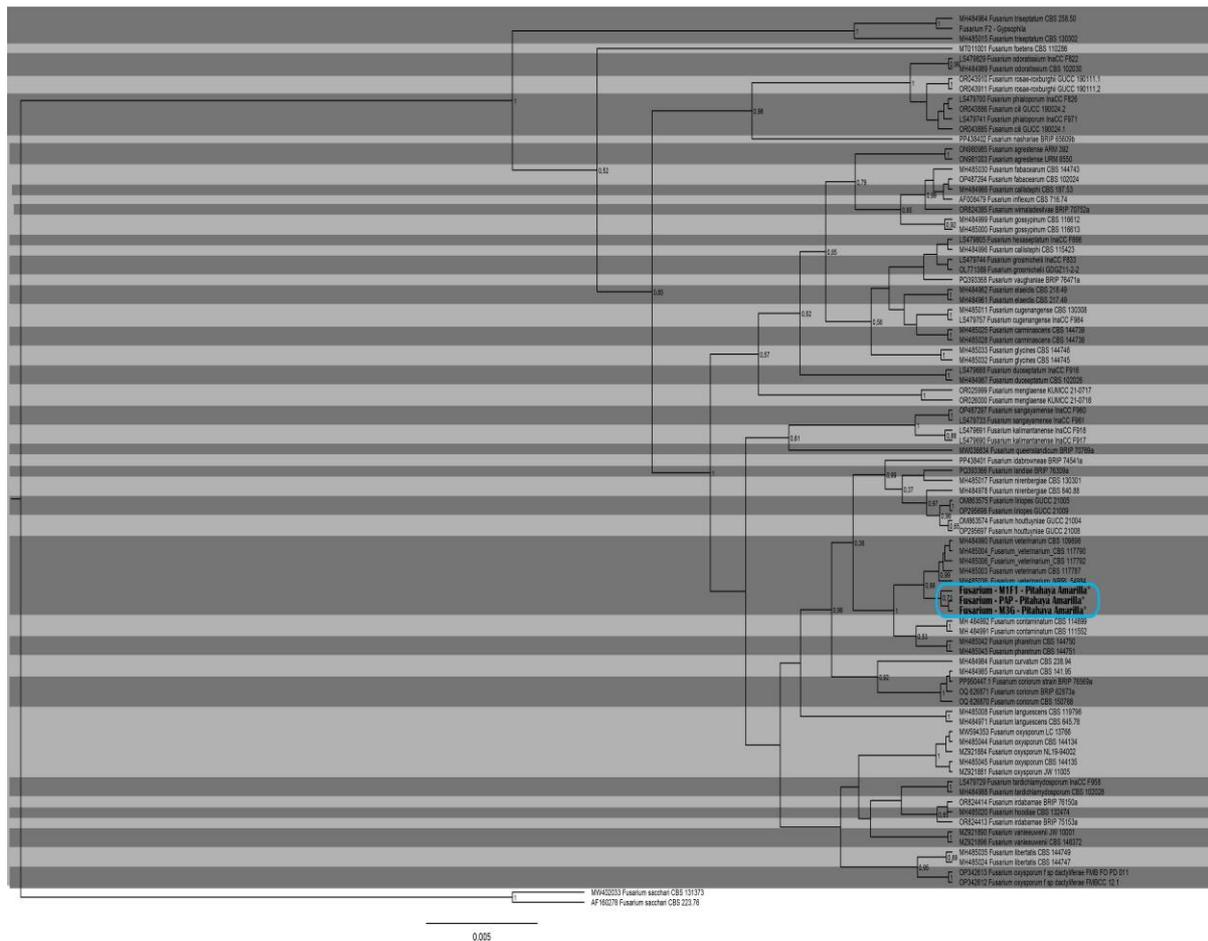


Figura 5. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis bayesiano de las secuencias TEF-1 α (Translation Elongation Factor) de 100 cepas pertenecientes al complejo de *Fusarium oxysporum* (FOSC). El valor de los nodos representa la probabilidad posterior bayesiana. *Fusarium sacchari* se usó como outgroup. La barra de escala indica el número de cambios esperados por sitio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ángel-García, C., Robledo-Buriticá, J., & Castaño-Zapata, J. (2018). COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE INOCULACIÓN DE *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae* EN PLÁNTULAS DE MARACUYÁ (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 21(1), 23-31.
<https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.659>
- Balendres, M., & Bengoa, J. (2019). Diseases of dragon fruit (*Hylocereus* species): Etiology and current management options. *Crop Protection*, 126, 104920.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104920>
- Benoît, T., Audonneau, N., Machouart, M., Debourgogne, A. (2019). Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice? *Journal de Mycologie Médicale*, 29(1), 56-58
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.01.003>
- Diebel, J., & Norda, J. (2024). *El clima y el tiempo promedio en todo el año en Palora, Ecuador*. Cedar Lake Ventures, Inc. Recuperado el 25 de noviembre de 2024 de <https://es.weatherspark.com/y/20618/Clima-promedio-en-Palora-Ecuador-durante-todo-el-año>
- Drummond, A.J. and A. Rambaut. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7(1): 214
- Duvkank, T., Vrandecic, K., Sudaric, A., Cosic, J., Siber, T., Matosa, M. (2023). First Report of Hemp Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* in Croacia. *Plants*, 12(18), 3305. <https://doi.org/10.3390/plants12183305>
- Erazo-Lara, A., García-Pastor, M., Padilla-González, P., Serrano, M., & Valero, D. (2024). Yellow Pitahaya (*Selenicereus megalanthus* Haw.) Growth and Ripening as Affected by Preharvest Elicitors (Salicylic Acid, Methyl Salicylate, Methyl Jasmonate, and Oxalic Acid): Enhancement of Yield, and Quality at Harvest. *Horticulturae*, 10(5), 493. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10050493>
- Fluctuante. (2024, octubre 18). *Exportaciones de Pitahaya Ecuador 2024*. <https://fluctuante.lat/agroexportaciones-ecuatorianas/2024/10/18/exportaciones-de-pitahaya-ecuador-enero-a-agosto-2024/#:~:text=Hasta%20agosto%20de%202024%2C%20Ecuador,reflejando%20un%20incremento%20del%2013%25.>
- Gai, Y., & Wang, H. (2024). Plant Disease: A Growing Threat to Global Food Security. *Agronomy*, 14(8), 1615. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081615>

- Gougherty, A., & Davies, J. (2021). Towards a phylogenetic ecology of plant pests and pathogens. *Philosophical Transactions Royal Society B*, (376).
<https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0359>
- Gutiérrez-Sánchez, A., Plasencia, J., Monribot-Villanueva, J., Rodríguez-Haas, B., Ruíz-May, E., Guerrero-Analco, J., Sánchez-Rangel, D. (2023). Virulence factors of the genus *Fusarium* with targets in plants. *Microbiological Research*, 277(127506), ISSN 0944-5013. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127506>
- Herrera-Leon, F., Sánchez, F., Bermudez, A., Barriga-Medina, N., Ramírez-Villacís, D., Herrera, K., Ruales, C., Leon-Reyes, A. (2022). *Alternaria alternata* causes bud blight of rose (*Rosa* sp.) in Cotopaxi, Ecuador. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 44(5), 673-679. <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2041726>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2024, julio). *Boletín Situacional Cultivo de Pitahaya*. https://sipa.agricultura.gob.ec/boletines/situacionales/2023/boletin_situacional_pitahaya_2023.pdf
- Ministerio de Producción, Comercio Exterior, inversiones y Pesca. (2023, abril 10). *Ecuador inicia las exportaciones de pitahaya a China*. Plataforma Gubernamental Financiera. <https://www.produccion.gob.ec/ecuador-inicia-las-exportaciones-de-pitahaya-a-china-2/>
- Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca. (2024, marzo 13). *Pitahaya rompe récord en exportaciones con más de USD 172 millones, en 2023*. Plataforma Gubernamental Financiera. <https://www.produccion.gob.ec/pitahaya-rompe-record-en-exportaciones-con-mas-de-usd-172-millones-en-2023/>
- Moreno, L., Luna, L., Escobar, L. (2021). Aislamiento e Identificación del Agente Causal de la Pudrición Basal en Frutos de Pitahaya (*Senicereus megalanthus*) Cultivada en el Departamento del Huila. *Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura*, 7(1), 21-26. <https://doi.org/10.23850/raa.v7i1.3727>
- Morillo, A., Manjarrés, E., Pedreros, M., Sanabria, D., Lizarazo, L., Morales, I., Pérez, R., Ruíz, I., Velásquez, J. (2023). *Plan de manejo tecnológico del cultivo de pitahaya*. <https://repositorio.uptc.edu.co/server/api/core/bitstreams/a8bb2b34-56ad-487e-bc5d-2b12848fba5b/content>
- Munkvold, G. (2017). *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins. In Moretti, A., & Susca, A. (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1542, 51-106. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_4
- Muñoz, V., Cisterna, V., France, A. (2020). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos* [en línea]. Chillan: Boletín INIA – Instituto de Investigaciones Agropecuarias, N° 428, 77-91. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/67165>

- Organización Panamericana de la Salud. (2019). *Curso de Micología en línea – Género Fusarium* [en línea]. <https://www.paho.org/es/file/86741/download?token=9rutLsts>
- Patel, R., Mehta, K., Prajapati, K., Shukla, A., Parmar, P., Goswami, D., Sarah, M. (2022). An anecdote of mechanics for *Fusarium* biocontrol by plant growth promoting microbes. *Biological Control*, 174, 105012. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105012>
- QIAGEN. (2023). *DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook*. <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=9bb59b74-e493-4aeb-b6c1-f660852e8d97&lang=en>
- Ramírez-Villacis, D.X., Barriga-Medina, N., Llerena-Llerena, S., Pazmino-Guevara, C., & Leon-Reyes, A. (2023). First Report of *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot on Broccoli in Ecuador. *Plant Disease*, 107(9). <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-23-0598-PDN>
- Riera, N., Ramirez-Villacis, D., Barriga-Medina, N., Alvarez-Santana, J., Herrera, K., Ruales, C., & Leon-Reyes, A. (2019). First Report of Banana Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Ecuador. *Plant Disease*, 103(4), 763. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0069-PDN>
- Rogério, J. (2022). *PODRIDÃO DO CAULE EM PITAIAS (Hylocereus megalanthus e H. polyrhizus), CAUSADA POR Diaporthe NO CEARÁ* [Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Ceará]. Centro De Ciências Agrárias Departamento De Fitotecnia Graduação Em Agronomia. https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/69196/3/2022_tcc_jlrsaraiva.pdf
- Romero, F., Cazzato, S., Walder, F., Vogelgsang, S., Bender, S., van der Heijden, G. (2021). Humidity and high temperature are important for predicting fungal disease outbreaks worldwide. *New Phytologist Foundation*, 234(5), 1533-1556. <https://doi.org/10.1111/nph.17340>
- Salazar-González, C., Serna-Cock, L., Gómez-López, E. (2016). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FUSARIUM ASOCIADO A PUDRICIÓN BASAL DEL FRUTO EN PITAHAYA (*SELENICEREUS MEGALANTHUS*). *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 277-285. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i2.21269>
- Sotomayor, A., Pitzaca, C., Sánchez, M., Burbano, A., Díaz, A., Nicolalde, J., Viera, W., Caicedo, C., & Vargas, Y. (2019). Evaluación físico química de fruta de pitahaya *Selenicereus megalanthus* en diferentes estados de desarrollo. *Enfoque UTE*, 10(1), 89-96. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v10n1.386>
- Tanner, A. (2021). *Re: How important is Bayesian posterior probability in phylogenetic analysis?* Retrieved from

https://www.researchgate.net/post/How_important_is_Bayesian_posterior_probability_in_phylogenetic_analysis/6057d912089eec3067490642/citation/download.

- Thrane, U. (2014). *Fusarium*. In Batt, A., & Tortorello, M. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, 76-81.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00141-5>
- Valencia-Chamorro, S., Páez, D., Guevara, J., Vilaplana, R. (2016). AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS HONGOS MÁS AGRESIVOS AISLADOS DE PITAHAYA AMARILLA (*Selenicereus megalanthus*) EN EL PERIODO POSCOSECHA. *Vitae*, 23(Supl. 1), S810-S814.
<https://www.proquest.com/scholarly-journals/aislamiento-identificación-y-evaluación-de-los/docview/1783660314/se-2>
- Vargas, Y., Pico, J., Díaz, A., Sotomayor, D., Burbano, A., Caicedo, C., Paredes, Ñ., Congo, C., Tinoco, L., Bastidas, S., Chuquimarca, J., Macas, J., Viera, W. (2020). *Manual Técnico del cultivo de Pitahaya*. INIAP. Manual N° 117 x. Joya de los Sachas, Ecuador, 39p.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5551/1/INIAPMANUAL117-2020.pdf>
- Vásquez-Castillo, W., Aguilar, K., Vilaplana, R., Viteri, P., Viera, W. & Valencia-Chamorro, S. (2016). Calidad del fruto y pérdidas poscosecha de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.) en Ecuador. *Agronomía Colombiana*, 34(1Supl.) doi: 10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58279
- Venbrux, M., Crauwels, S., & Rediers, H. (2023). Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Frontiers in Plant Science*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. (2020). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 439-453.
<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>
- Vilaplana, R., Alba, P., Valencia-Chamorro, S. (2018). Sodium bicarbonate salts for the control of postharvest black rot disease in yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Crop Protection*, 114, 90-96.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.021>
- Williams-Woodward. (2001). *Simplified Fungi Identification Key*. The University of Georgia. Cooperative Extension Service, College of Agricultural & Environmental Sciences.
<https://plantpath.caes.uga.edu/content/dam/caes-subsite/plant-pathology/extension-pdfs/PDL-fungi-key.pdf>

- Yaser, H., & Abass, M. (2022). Morphological and molecular identification study of rose and lantana fungal leaf spot pathogens. *Basra Journal of Science*, 40(2), 342-356.
https://www.researchgate.net/publication/363294313_Morphological_and_molecular_identification_study_of_rose_and_lantana_fungal_leaf_spot_pathogens
- Zakaria, L. (2023). *Fusarium* Species Associated with Diseases of Major Tropical Fruit Crops. *Horticulturae*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030322>
- Zarrin, M., Ganj, F., & Faramarzi, S. (2016). Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biomedical reports*, 4(4), 471–474.
<https://doi.org/10.3892/br.2016.615>

ANEXO 1: PREPARACIÓN MEDIO V8 Y CZAPEK

Medio	Reactivos	Cantidad (para 1L)	Anotaciones
V8	Jugo V8	200 ml	Autoclavar 20 min a 121°C
	Maltosa	20 gr	
	Asparagina	1 gr	
	Extracto de Malta	10 gr	
	CaCO ₃	3 gr	
	Agar	15 gr	
CZAPEK	Sacarosa	30 gr	Autoclavar 20 min a 121°C
	Nitrato de sodio (NaNO ₃)	3 gr	
	Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄ -2H ₂ O)	1 gr	
	Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0,5 gr	
	Cloruro de potasio (KCl)	0,5 gr	
	Sulfato ferroso (FeSO ₄ -7H ₂ O)	0,01 gr	
	Agar	21 gr	