

ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DEL TALLO PROVOCADO POR *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz) EN *Hylocereus costaricensis*, EN COSTA RICA

Kenneth Retana-Sánchez¹*, Mónica Blanco-Meneses^{**}, Oscar Castro-Zúñiga^{**}

Palabras clave: Cáncer del tallo; *Hylocereus costaricensis*; *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.).

Keywords: Stem canker; *Hylocereus costaricensis*; *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.).

Recibido: 04/05/18

Aceptado: 21/08/18

RESUMEN

En el 2011 y 2012 se realizó una investigación de los agentes causales de las enfermedades asociadas al cultivo de Pitaya (*Hylocereus costaricensis*) en Costa Rica. Una de las más importantes durante el periodo de estudio, debido a su alta incidencia (100%), fue el cáncer en el tallo. Los síntomas observados fueron pequeñas manchas anaranjadas y rojizas irregulares y lesiones de coloración beige-grisáceas con el centro abultado. Para determinar el agente causal se recolectaron 85 muestras, cladodios completos con diferentes estados de desarrollo de la enfermedad, a partir de los cuales se realizaron 40 aislamientos. De estos creció un organismo en forma consistente, con el cual se llevó a cabo la identificación, caracterización morfológica y molecular así como la verificación de los postulados de Koch. De acuerdo con la forma de crecimiento, coloración del micelio y la morfología de los arthroconidios y de las características moleculares (secuenciación de la región ITS), el patógeno asociado a los síntomas presentó un 99% de similitud con *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) (no. de accesión KJ513460, del hongo aislado en Costa Rica). En las pruebas de los postulados de Koch se obtuvo un 92% de infección y se presentó una sintomatología similar a la observada en el

ABSTRACT

Etiology of stem canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz) on *Hylocereus costaricensis*, in Costa Rica. A survey of the diseases affecting pitahaya (*Hylocereus costaricensis*) in Costa Rica was carried out during 2011 and 2012. One of the most important, due to its high incidence (100%), was the stem canker. The symptoms observed were irregular orange and red small spots and beige-gray coloration with raised center. In order to determine the causative agent, 85 samples were collected, complete cladodes with different stages of disease development, from which 40 isolates were made. From these isolates, an organism grew in a consistent manner, with which the identification, morphological and molecular characterization, as well as verification based on Koch's postulates was carried out. Based on the form of growth, mycelial coloration and the morphology of the arthroconidia, and the molecular characteristics (sequencing of the ITS region), the pathogen associated with the symptoms presented a 99% similarity with *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) (No. of accession KJ513460, of the isolated fungus in Costa Rica). According to Koch's postulates, 92% of infection was obtained and a similar

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: kretana@uned.ac.cr

* Universidad Estatal a Distancia, Escuela de Ciencias Exactas, Cátedra de Ciencias Agropecuarias, Costa Rica.

** Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Costa Rica.

campo, además, se recuperó el mismo organismo que fue inoculado. Este es el primer reporte de este hongo causando daños en el tallo de *Hylocereus costaricensis* en Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La pitahaya o fruta dragón (*Hylocereus costaricensis*) es una de las frutas tropicales más populares en el mundo. Se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de América, Asia y Oceanía. Los principales países productores de este fruto son Vietnam, Colombia, Nicaragua, México, Israel y algunos países orientales (Crane y Balerdi 2005, Díaz 2005, Chuang *et al.* 2012).

A nivel mundial se cultivan comercialmente 4 especies: *H. undatus* de pulpa blanca y *H. polyrhizus*, *H. costaricensis* e *H. ocamponis*, de pulpa roja. En Costa Rica, la pitahaya es un cultivo poco aprovechado, a pesar de contarse con una especie nativa, *H. costaricensis*. (Morales 2000). La producción de esta fruta se limita a pocas plantaciones comerciales ubicadas principalmente en las zonas Pacífico Central y a fincas experimentales en el Pacífico norte del país, en donde se cultivan diversos genotipos.

El auge en el interés en este cultivo se debe a que en el fruto de este cactus se han encontrado pigmentos nitrogenados, solubles en agua que dan coloraciones rojo-violetas y amarillas, llamados betalaínas. Estos se mantienen estables en un amplio ámbito de pH (3-7), lo que las hace una fuente importante de colorantes naturales para alimentos, medicinas y cosméticos (Hessen y Lenin 1995, Wybraniec *et al.* 2001, Stintzing *et al.* 2001, Strack *et al.* 2003).

Una de las problemáticas que se presentan en este cultivo son las distintas patologías que afectan tanto el tallo como el fruto. En las principales especies comerciales se reportan daños causados por los siguientes patógenos: *Fusarium*

symptomatology to the one observed on plants from the field, in addition, the same organism that was inoculated was recovered. This is the first report of this fungus causing damage to the stem of *Hylocereus costaricensis* in Costa Rica.

oxysporum, *Fusicoccum* sp., *Dothiorella* sp., *Curvularia lunata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora* sp., y *Alternaria* sp. (Rodríguez 2000, Liou *et al.* 2000, OIRSA 2000, FAO 2004, Valencia *et al.* 2004, Gunasena *et al.* 2006, Palmateer y Ploetz 2007, Taba *et al.* 2007, Wright *et al.* 2007, Masratul *et al.* 2009, Masyahit *et al.* 2009a, Masyahit *et al.* 2009b, Awang *et al.* 2010, Ben-Ze'ev *et al.* 2011, Chuang *et al.* 2012, Lan *et al.* 2012).

En los últimos años, en Malasia y en Estados Unidos, se encontró el hongo *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) como patógeno de los tallos y frutos de pitahaya. Este causa síntomas similares al cáncer del tallo que se ha observado en plantaciones de pitahaya en Costa Rica (Masratul *et al.* 2013, Sanahuja *et al.* 2016).

Este hongo es reconocido como patógeno en árboles como toronja, naranja dulce y agria, eucalipto, álamo, mango, y otras plantas como higo y jatrofa. El mecanismo de ingreso en la planta es a través de heridas en tallos sanos, ya que es un organismo oportunista (Slipper *et al.* 2004, Polizzi *et al.* 2009, Ray *et al.* 2010, Hassan *et al.* 2011).

Los síntomas que genera en tejido lignificado son gomosis, chancros y muerte regresiva de brotes, con la presencia de masas de esporas negras que se ubican debajo de la corteza. En *H. undatus* y *H. polyrhizus* este patógeno produce pequeños puntos circulares anaranjados hundidos, que posteriormente, se vuelven chancros. En la superficie de estos últimos se forman picnidios y por último, los tallos se pudren (Polizzi *et al.* 2009, Chuang *et al.* 2012).

Las condiciones ambientales que favorecen la incidencia de este patógeno son las características de la época seca. En *Jatropha curcas* se observó un incremento en la incidencia de la pudrición de la raíz provocada por *N. dimidiatum* (Penz.), debido a periodos prolongados de sequía. Asimismo, en árboles de toronja en periodos de calor extremo y humedad relativa baja, la infección por este hongo se incrementa (Hassan *et al.* 2011, Reis y Liparini 2013).

El daño que provoca este organismo aumenta cuando la planta está bajo estrés por regímenes hídricos desfavorables, condiciones secas y altas temperaturas. Sin embargo, en pitahaya, no alcanza altos valores de severidad (1.2-24%) (Oren *et al.* 2001, Masratul *et al.* 2013).

Debido a la alta incidencia del cáncer en tallos de pitahaya en Costa Rica, y su impacto sobre la calidad del fruto, el objetivo de esta investigación fue el aislamiento, identificación y verificación de los postulados de Koch del organismo causal de esta enfermedad en *H. costaricensis* y el seguimiento de la evolución de los síntomas en el tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

La investigación se realizó en la finca “El Brillante”, única plantación comercial de pitahaya en Costa Rica al momento del estudio, en la cual se produce esta fruta bajo manejo orgánico y está localizada en Miramar de Puntarenas (10°6'14" latitud norte y 84°48'49" longitud oeste) en Costa Rica. La población en el área de estudio fue 2666 plantas.ha⁻¹, de las cuales se seleccionó 992 plantas distribuidas en 38 hileras para realizar este trabajo.

En cada una de las hileras, se observaron los diferentes síntomas presentes en los tallos, y se recolectaron 40 muestras (cladodios completos). Cada una de estas se envolvieron en papel periódico humedecido y se colocaron en una bolsa plástica, con la identificación correspondiente. El material que se recolectó se llevó al Laboratorio de

Fitopatología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica, para el respectivo análisis.

Seguimiento de la evolución de los síntomas

Se realizó un seguimiento en el campo de la evolución de los síntomas a lo largo del tiempo. Se marcaron 60 cladodios con el daño característico de la enfermedad a lo largo de la plantación y se procedió a tomar fotos cada 15 días, durante un periodo de un año para determinar los cambios morfológicos, de tamaño y de coloración de los síntomas.

Caracterización de síntomas y aislamiento del agente causal

Se caracterizaron visualmente, los síntomas en cada una de las 40 muestras recolectadas. Los aspectos considerados fueron el color, tamaño, textura, presencia o no de halo clorótico y de cuerpos fructíferos sobre las lesiones. Esto último se llevó a cabo con ayuda del estereoscopio, Motic SMZ-168 (Hong Kong, China).

A partir de cada uno de síntomas, se realizó el aislamiento del agente causal mediante la metodología descrita por French y Hebert (1980) para hongos y bacterias. La desinfección de material se llevó a cabo con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1% durante 50 y 20 segundos, respectivamente.

Los medios de cultivo utilizados fueron agar-papa-dextrosa al 1,5% (PDA) y V8 (Atlas 2010). Para determinar cada uno de los síntomas, se rasgó el tejido de manera longitudinal y se extrajeron segmentos de la zona de avance en la parte interna de los mismos. Se realizaron con 2 repeticiones por cada medio utilizado para un total de 160 aislamientos. El material se incubó en una cámara a temperatura de 25-30°C y en oscuridad por un periodo de 7 días.

Paralelamente, para cada una de las muestras se colocaron 5 segmentos de tejido sintomático en una cámara húmeda. Se evaluaron los cambios ocurridos en el material durante 2 semanas.

Identificación y caracterización morfológica del agente causal

La identificación del agente causal se realizó mediante la observación de las estructuras reproductivas del patógeno. Esto se llevó a cabo con el microscopio de luz, Olympus modelo BX41BF (Tokio, Japón) con un lente de aumento de 40X.

Se realizó la caracterización morfológica del hongo con cultivos axénicos obtenidos de PDA y V8. Para esto se colocó un disco de papel con micelio de 1 cm² en los medios antes mencionados y llevaron una cámara en oscuridad, a 25°C, durante 7 días. Se utilizó 5 cajas Petri por medio de cultivo.

Los aspectos evaluados fueron hábito y tasa de crecimiento del hongo, la cual se determinó con una regla graduada en milímetros, que se colocó en la parte media de la caja Petri y se midió el radio del desarrollo del micelio por día. También se valoró la apariencia y coloración de la colonia mediante la observación de esta en el estereoscopio Motic SMZ-168 (Hong Kong, China). Por último, en el microscopio de luz Olympus modelo BX41BF (Tokio, Japón), con un lente de aumento de 40X, se observó la morfología de los conidios.

Identificación de los pseudoestromas

El crecimiento de los pseudoestromas se realizó mediante la colocación de trozos de cultivo puro del hongo en medio de cultivo agar-clavel (2,5% de agar y segmentos de hojas de clavel esterilizadas) (Atlas 2010). La identificación de estas estructuras se llevó a cabo a través de la observación con el mismo microscopio de luz y el mismo lente.

Identificación molecular

Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)

La identificación molecular se realizó en el Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección del CIPROC, UCR,

para lo cual se extrajo ADN a partir de micelio fresco del hongo, con el método CTAB (Murray y Thompson 1985). El ADN fue cuantificado con un espectrofotómetro BioPhotometer Plus 6132 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se llevó a una concentración final de 80 ng.μL⁻¹.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación del ADN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con los cebadores específicos: ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAA-GG-3') descritos por White *et al.* (1990), que amplifican la secuencia parcial del ARN del gen ribosomal 18S, el espaciador interno transcrito 1, el ARN del gen ribosomal 5.8S, el espaciador interno transcrito 2 y la secuencia parcial del ARN del gen ribosomal 28S.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL, que consistió en 15,25 μL de agua desionizada ultrapura, 2,5 μL de buffer 10X (1X), 2,5 μL de dNTPs (2 mM), 1,25 μL de cada cebador (10 μM) y 0,25 μL de DreamTaq DNA Polymerase (1 U.μL⁻¹) (Fermentas, Massachusetts, USA). Se utilizó un control negativo que consistió de una reacción sin ADN. La reacción de amplificación se llevó a cabo a través del siguiente perfil térmico: predesnaturalización inicial a 96°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de: desnaturalización a 96°C durante 1 minuto, anillamiento a 56°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

El producto de PCR con aproximadamente 600 pares de bases para ITS, se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%), se comparó con un marcador de peso molecular de 100 pb, GeneRuler de Fermentas (Massachusetts, USA). El producto se purificó mediante la Exonuclease I (Fermentas, Massachusetts, USA) y se llevó a una concentración de 50 ng.μL⁻¹. Posteriormente, se envió a secuenciar a la empresa Macrogen Inc., Corea del Sur, compañía líder en la industria genética con más de dos décadas de experiencia en la secuenciación de ADN.

Se obtuvo secuencias en ambas direcciones para cada muestra generada a partir de ciclos fluorescentes utilizando un secuenciador modelo 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Alineamiento de las secuencias y análisis filogenéticos

La calidad de las secuencias se confirmó con un alineamiento bidireccional y por comparación con los cromatogramas mediante el programa BioEdit (Hall 1999); además, se cortó las terminaciones 5' y 3' de las cadenas para facilitar el alineamiento. Se utilizó la herramienta informática Blast (Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information (NCBI)), a partir de la cual se comparó la secuencia generada frente a las secuencias que se encuentran en la base de datos del GenBank.

Verificación de los postulados de Koch

La determinación de la capacidad de infección del hongo se llevó a cabo en campo, mediante la inoculación de *N. dimidiatum* (Penz.) en tejido sano de plantas de pitahaya de 5 años de edad. Se implementaron 2 tratamientos: inoculación con heridas y sin heridas y se comparó con un testigo, todo en un mismo cladodio. Esto se llevó a cabo en 2 tallos con 12 repeticiones cada uno, para cada caso.

En cada cladodio, previamente desinfectado con hipoclorito de sodio al 1%, se llevó a cabo la inoculación sin heridas mediante la colocación de 12 discos de aproximadamente 1 cm² medio PDA con el hongo purificado. Luego, en la cara adyacente, se colocó la misma cantidad de discos con el patógeno en puntos donde al tejido se le hizo heridas con una aguja esterilizada (inoculación con heridas). Por último, en lado posterior del tallo, se provocó daños con la aguja sin colocar el micelio, lo que se consideró como el testigo.

Para favorecer la infección, cada cladodio se cubrió con una bolsa plástica dentro de la cual se colocó varias hojas de papel toalla humedecido. Tres días después se retiró la bolsa y se procedió a tomar fotos cada 15 días a cada repetición para evaluar la infección y el avance de los síntomas durante 10 meses.

Los postulados de Koch se confirmaron con el reaislamiento del hongo inoculado, mediante el protocolo descrito por French y Hebert (1980). La identificación del organismo obtenido se realizó mediante la evaluación de las características morfológicas del mismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante este estudio se estableció la etiología del hongo que causa el cáncer del tallo en plantas de pitahaya que se cultivan en Costa Rica. A nivel de campo se encontró diversidad de síntomas en los tallos, asociados a este patógeno. Con la evolución de la enfermedad, se observaron cambios en la coloración y en la morfología de las lesiones que el hongo provoca en los tejidos.

Caracterización y seguimiento de la evolución de síntomas

Los síntomas asociados a esta enfermedad inician como manchas circulares anaranjadas con un punto oscurecido en el centro y se puede dar o no la formación de halo clorótico incompleto (Figura 1A). Posteriormente, estas manchas se tornaron de color marrón-rojizo con un halo clorótico completo (Figura 1B). Conforme avanza el síntoma, se presentaron lesiones de color beige con un halo rojizo (Figura 1C) y lesiones beige-grisáceas (Figuras 1D y 1E), ambas con el centro abultado y agrietado; además, se formó un halo clorótico difuso e irregular alrededor de las mismas. En estados avanzados, ocurre la coalescencia de varias lesiones que tienden a desprenderse dejando un orificio en el tallo del cactus (Figura 1F).

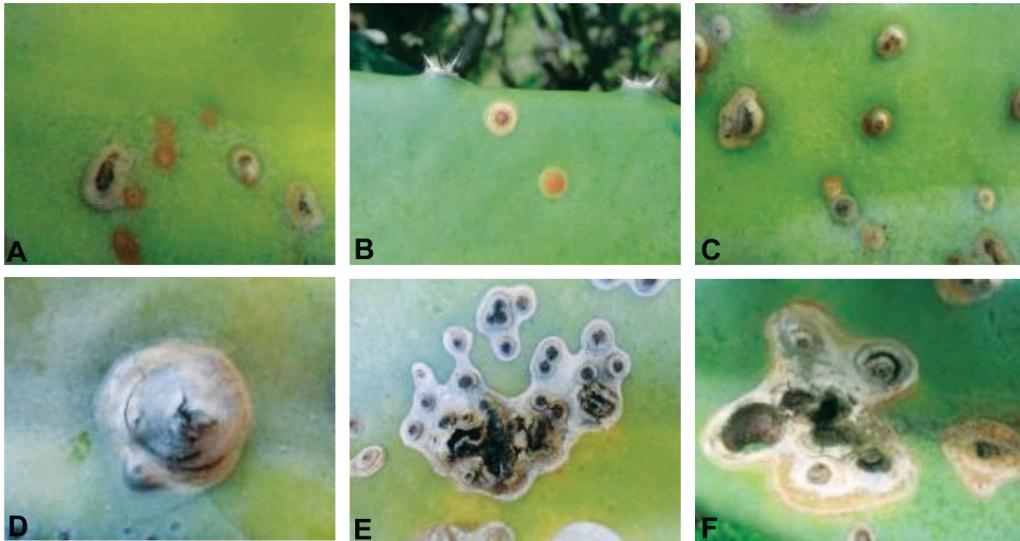


Fig. 1. Secuencia de síntomas de la enfermedad provocada por *N. dimidiatum*. A. Síntoma inicial. B. y C. Evolución de los síntomas. D. y E. Síntomas finales. F. Coalescencia de lesiones.

Los síntomas descritos concuerdan con los señalados por Lan *et al.* (2012) y Masratul *et al.* (2013). Estos autores describen al hongo *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) como el agente causal de las manchas hundidas color naranja o rojiza-marrón sin halo aparente que afectan los cladodios y que en estados avanzados se expanden y forman un chancro. Asimismo, Ezra *et al.* (2013) asocian este patógeno con pudriciones internas necróticas en fruto.

Identificación y caracterización morfológica del agente causal

De los aislamientos realizados a partir de zonas de tejido con los síntomas descritos, se obtuvo el crecimiento de un hongo con micelio de color verde oliva oscuro y de apariencia algodonosa (Figuras 2A y 2B). La observación al microscopio de las estructuras reproductivas del hongo, en cada uno de los aislamientos, permitió determinar que corresponde al mismo organismo en todos los casos. Dichas estructuras consistieron en una hifa modificada que se segmentó en conidios rectangulares alargados-truncados y de borde cóncavo, hialinas o con tonalidades levemente marrón (Figura 2C). No se obtuvo crecimiento de este organismo en la cámara húmeda.

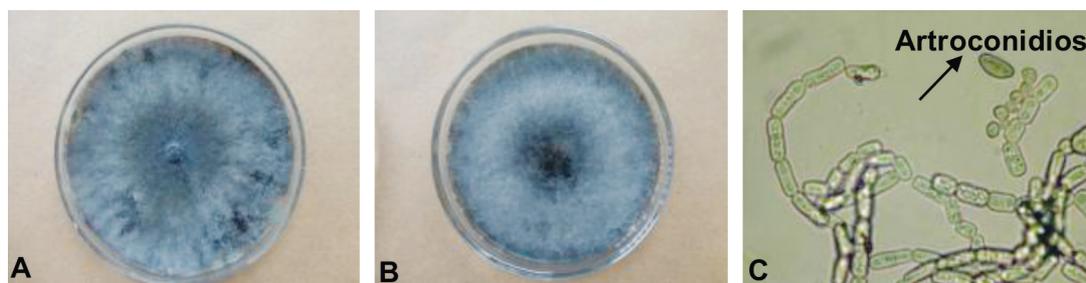


Fig. 2. Crecimiento de *Neoscytalidium dimidiatum* en dos medios de cultivo diferentes. A. PDA. B. V8. C. Arthroconidios del hongo (40X).

Las características mencionadas coinciden con la descripción realizada por Crous *et al.* (2006) y Phillips *et al.* (2013) de *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers, en la cual se indica que pertenece a la clase Hyphomycetes y se describe como un hongo que forma arthroconidios holoblásticos, catenados, de paredes delgadas, pulverulentos, desarticulados, cilíndrico-truncados, oblongo-obtusos, fuscos, crassitunicados y con 0-2 septos. El micelio es aéreo y exhibe una morfología del tipo coelomicetosa (sinasexual), el cual es inmerso, ramificado y septado. Presenta un estroma conidiomático irregularmente multilocular, picnidial o unilocular y de tonalidad marrón. Las células conidiógenas son discretas, determinadas o indeterminadas, hialinas, ampuliformes, lisas, doliiformes o cilíndricas, que proliferan enteroblásticamente, en algunas ocasiones ocurren engrosamientos periclinales distintivos. Los ascomas aún no se han reportado.

Este hongo pertenece a la familia Botryosphaeriaceae, en la cual, a través de análisis filogenéticos, se reconocen 17 géneros. Estos se diferencian por algunas características de los

conidios tales como la pigmentación, el grosor de la pared y la tabicación. Además, la presencia o ausencia de paráfisis que se dan en las conidiomas favorece la diferenciación entre géneros (Phillips *et al.* 2013).

Chuang *et al.* (2012) y Masratul *et al.* (2013) mencionan la formación de picnidios en la superficie de las lesiones y en los medios en donde realizaron los aislamientos. Los resultados obtenidos en esta investigación difieren de lo anterior, ya que según lo observado en campo no ocurre la formación de cuerpos fructíferos sino de pseudoestromas. Además, en medio de cultivo agar-clavel se obtuvo la formación de hifas con arthroconidios que se cruzan y, alrededor de las cuales, se forman pseudoestromas con forma circular y de color marrón-negro, que se endurecen en la superficie de las lesiones y son suaves en medio de cultivo (Carranza, J. 12 de feb. 2014. Descripción de los arthroconidios de *N. dimidiatum* Penz (comunicación personal). San Pedro, Costa Rica, Universidad de Costa Rica). Estas pueden ser el inicio de la producción de picnidios o peritecios (Figura 3).



Fig. 3. Pseudoestromas de *N. dimidiatum*. A. Crecimiento sobre la lesión generada por el hongo en *Hylocereus* spp. B. Crecimiento en caja Petri con medio de cultivo agar-clavel, vistos al estereoscopio. C. Arthroconidios contenidos en los pseudoestromas (40X).

Con base en las pruebas morfológicas, durante los primeros 2 días el hongo presentó un micelio blanco levemente algodonoso en los medios utilizados. Al tercer día se presentó un cambio en la coloración en el centro del mismo, en PDA se tornó verde oliva y en V8 se observó de color verde grisáceo, ambos con bordes blancos. En los días posteriores, la coloración se mantuvo y se extendió hacia los bordes de la caja Petri hasta tomar un color completamente verde oliva-grisáceo en ambos medios, más oscuro y algodonoso en V8 en comparación con el crecimiento obtenido en PDA. La colonización de las cajas Petri se dio en 3 días a una velocidad de 2,8 cm/día, en ambos medios.

Los resultados concuerdan con la descripción realizada por Masratul *et al.* (2013), quienes señalan que este hongo en medio de cultivo PDA presenta un micelio con apariencia de vellosidad, de color verde oliva-grisáceo con una posterior pigmentación gris oscuro-negro. Asimismo, la velocidad de crecimiento obtenida fue similar con la señalada por estos autores, la cual fue de 3,0 cm/día por un periodo de 3 días.

Identificación y caracterización molecular del agente causal

El análisis de ADN extraído a partir del micelio y la comparación de complementariedad de secuencias de bases, según el GenBank, permitió confirmar la identidad de este hongo como

Neoscytalidium dimidiatum (Penz.). Se obtuvo un 99% de similitud y 0% de error entre la secuencia de bases del ADN extraído y la secuencia depositada en dicha entidad (N° de accesión FJ648577). La secuencia proveniente del aislamiento se introdujo en el GenBank bajo el número de accesión KJ513460.

Verificación de los postulados de Koch

Según los resultados de la prueba de verificación de los postulados de Koch, en cada cladodio, el ingreso y desarrollo del hongo ocurrió en 11 puntos de los 12 inoculados en los cladodios, a los cuales se les realizó heridas previamente, por lo que se obtuvo un 92% de infección. En el caso del testigo, se dio la cicatrización de las heridas en las 2 semanas posteriores al inicio del ensayo, sin que se presentaran síntomas del patógeno en el tejido.

En los tallos inoculados sin heridas no se presentó la infección. Con base en esto y en observaciones en campo, se determinó que este patógeno depende de la ruptura de la epidermis para ingresar en los cladodios. Lo anterior concuerda con lo indicado por Elliot y Edmond (2003), quienes mencionan que algunos anamorfos en Botryosphaeriaceae son organismos invasores de heridas y atacan el huésped cuando se encuentra sometido bajo algún tipo de estrés.

En los tejidos infectados, 3 días después de realizada la inoculación (ddi), se observó la formación de manchas anaranjadas, las cuales

corresponden al síntoma inicial de la enfermedad en estudio (Figura 4A). A los 35 ddi la mancha

adquirió un color beige-anaranjado, con el centro cicatrizado y de color gris (Figura 4B).

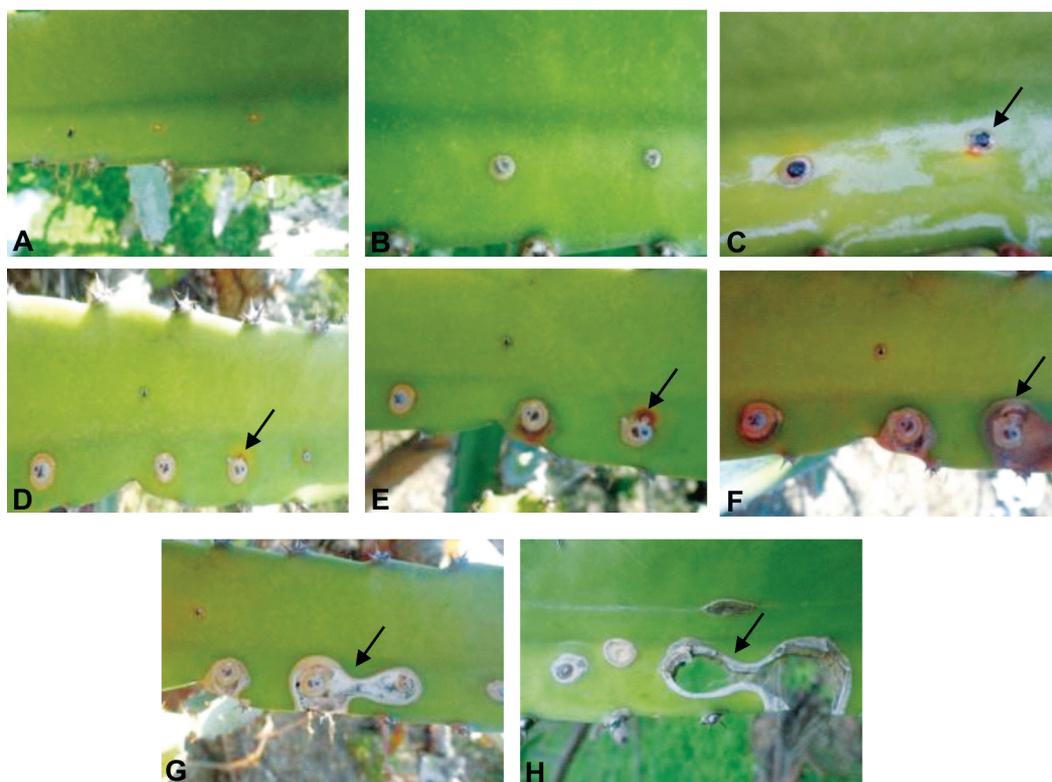


Fig. 4. Secuencia del daño provocado por el hongo en tallos de pitahaya. A: tres días. B: treinta y cinco días. C: ochenta días. D: ciento veinticinco días. E: ciento cuarenta días. F: ciento setenta días. G: doscientos días. H: trescientos días, después de la inoculación. Las flechas negras señalan el desarrollo de infecciones conjuntas del hongo y la bacteria *E. hormaechei*.

Ochenta días después de la inoculación se dio el crecimiento de las lesiones y se intensificó el color anaranjado en los bordes con necrosamiento en el centro de las mismas (Figura 4C). Lo anterior correspondió a la zona de avance de la enfermedad, la cual que se mantuvo con una coloración y una extensión similar hasta los 125 ddi (Figura 4D).

A partir de los 140 ddi y hasta los 170 ddi se presentaron los síntomas finales de la enfermedad. Estos fueron lesiones con apariencia de chancro, de coloración grisácea, con el centro

levantado y agrietado y de textura corchosa (Figuras 4E y 4F).

Paralelo a lo descrito, a partir de los 125 ddi, se observó un pequeño halo de color rojizo, el cual evolucionó hasta convertirse en una mancha blanca irregular y hundida (flechas negras en las Figuras 4D, 4E, 4F y 4G). Con base en observaciones en campo, esto se debió a la infección conjunta de *N. dimidiatum* (Penz.) y *Enterobacter hormaechei*, asociación que no siempre ocurre en todas las lesiones provocadas por el hongo.

Aproximadamente trescientos días después de la inoculación, el tejido afectado por ambos organismos se desprendió y dejó un orificio en el tallo (Figura 4H). En la Figura 5 se

muestra los síntomas causados únicamente por la bacteria, los cuales son similares a los descritos anteriormente.



Fig. 5. Lesiones provocadas por la bacteria *Enterobacter hormaechei* en el cultivo de la pitahaya.

Se obtuvo una situación similar en algunos tallos que se marcaron con pintura de agua, los cuales, mostraron una reacción de quemadura en el

área teñida, días posteriores a la demarcación. Este daño avanzó hasta convertirse en un hueco en el tallo (Figura 6).

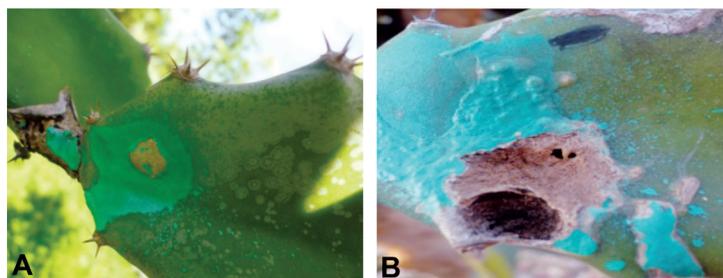


Fig. 6. Respuesta hipersensible de la planta de pitahaya al recubrimiento de pintura de agua. A. 15 y B. 120 días después de la demarcación.

Se presume que lo ocurrido fue el resultado de una fuerte respuesta hipersensible, por parte de la planta, en ambos casos. Se observó que este mecanismo de defensa le permite a la planta frenar eficazmente el progreso del hongo (Figura 1E), de la bacteria (Figura 5) o la asociación de ambos patógenos (Figura 4H). Lo anterior se puede deber a los altos contenidos de calcio que la planta es capaz de almacenar en forma de oxalato, tanto dentro como fuera de células especializadas llamadas idioblastos (Franceschi y Horner 1980, Webb 1999, Faheed *et al.* 2012).

Cabe señalar que no se obtuvo la tonalidad rojiza que se presenta antes de la coloración beige (Figura 1B). Lo anterior se pudo deber a cambios en la interacción patógeno-ambiente, por las condiciones secas y calurosas que predominaron durante la época en que se desarrollaron las pruebas, para verificar los postulados de Koch (agosto 2012 - mayo 2013) (IMN 2013), y a la mezcla de genotipos que se cultivan en el sitio de la investigación, ya que quizás se dan variaciones en la capacidad de defensa de cada uno de estos.

Los resultados de este ensayo no concuerdan con lo descrito por Masratul *et al.* (2013), debido a que estos mencionan un periodo entre síntomas iniciales y finales de 14 días. Además, la descripción de la secuencia de síntomas difiere con la que se presenta en este trabajo, principalmente en los estados avanzados, ya que estos autores indican una pudrición por completo del tallo. Según lo observado en campo, este hongo no provoca pudriciones en los cladodios, estas son causadas más bien por bacterias.

Etiología de la enfermedad

En el sitio de estudio, la enfermedad se presentó en todas las unidades de producción (100% de incidencia). Esto se debe principalmente a heridas sobre los tejidos, las cuales son producto de las podas continuas que se le hacen a las plantas como parte del manejo fitosanitario para el control de otras enfermedades, además, en la plantación se encuentran insectos que provocan lesiones al alimentarse de los tallos (mayormente hemípteros de la familia Coreidae). Asimismo, el crecimiento y roce entre los cladodios generan daño mecánico por el cual puede ingresar este patógeno (Retana 2015).

Las fuentes de inóculo de la enfermedad son los tallos con lesiones viejas a los cuales no se les da un manejo adecuado. Masratul *et al.* (2013) señalan que la alta incidencia y severidad de esta enfermedad en la pitahaya que se cultiva en Malasia se deben al deficiente manejo sanitario que se le da a este cultivo.

Con respecto a la severidad del hongo en plantaciones nacionales, este no provoca un fuerte impacto, en un año de evaluación alcanzó 3,9% de daño (Retana 2015). Valores cercanos a este se alcanzaron en plantaciones de pitahaya afectadas por este organismo en Malasia (Masratul *et al.* 2013).

Con base en observaciones de campo, se presume que el bajo nivel de daño se debió a que la planta presenta una fuerte respuesta hipersensible, por tanto, el daño observado corresponde a una alta incidencia de este patógeno por planta más que al desarrollo del mismo en el tejido.

Lo anterior se respalda con los resultados obtenidos en las pruebas de inoculación, ya que se alcanzó los síntomas finales en aproximadamente 6 meses (Figura 4G). Esto concuerda con lo mencionado por Polizzi *et al.* (2009), quienes indican que en arboles de naranja el hongo provocó síntomas en este mismo lapso de tiempo.

Cabe mencionar que las condiciones de época seca, alta temperatura y la baja precipitación, favorecen el desarrollo del patógeno en los tejidos afectados. Esto se puede asociar con el estrés en las plantas que causan las condiciones adversas como la alta radiación y el estrés hídrico y térmico, lo que podría generar una reducción en la capacidad de las plantas para frenar la infección o el desarrollo del hongo (Retana 2015). En relación con esto, Hassan *et al.* (2011) señalan que en cítricos, ante un periodo de altas temperaturas, se predispone a los árboles al ataque de este patógeno.

Hasta el momento, este hongo se menciona como patógeno en tallos y frutos de pitahaya en China, Taiwán, Malasia e Israel, países en donde se considera una enfermedad que pone en riesgo la industria de este cultivo (Lan *et al.* 2012, Chuang *et al.* 2012, Masratul *et al.* 2013, Ezra *et al.* 2013). Este es el primer estudio sobre la etiología del patógeno *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz) como causante del cáncer del tallo en *Hylocereus costaricensis* en Costa Rica.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a Julieta Carranza Velázquez de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, por el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Atlas, R. 2010. Handbook of microbiological media. Fourth Edition. Washington, USA, ASM Press-CRC Press. 2036 p.
- Awang, Y; Ghani, M; Sijam, K. 2010. Effects of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Monilinia fructicola* on quality of red flesh dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). Acta Horticulturae 880:431-438.

- Ben-ze'ev, I; Assouline, I; Levy, E; Elkind, G. 2011. First report of *Bipolaris cactivora* causing fruit blotch and stem rot of dragon fruit (pitaya) in Israel. *Phytoparasitica* 39:195-197.
- Chuang, M; Ni, F; Yang, H; Shu, S; Lai, S. 2012. First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Disease* 96(6):906.
- Crane, J; Balerdi, C. 2005. The pitaya (*Hylocereus undatus* and other *costaricensis*) in Florida. Florida, United States, University of Florida. 9 p.
- Crous, P; Slippers, B; Wingfield, M; Rheeder, J; Marasas, J; Philips, A; Alves, A; Burgess, T; Barber, P; Groenewald, J. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55:235-253.
- Díaz, J. 2005. Biología y manejo postcosecha de pitahaya roja y amarilla (*Hylocereus costaricensis* y *Selenicereus costaricensis*). *Revista La Calera* 6:44-49.
- Elliot, M; Edmond, R. 2003. Systematic study of *Natrassia mangiferae*, the cause of madrone canker. Oregon, United States, Proceedings of the 51st Western International Forest Disease Work conference 1-4.
- Ezra, D; Liarzi, O; Gat, T; Hershovich, M. 2013. First report of internal black rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* (Pitahaya) fruit in Israel. *Plant Disease* 97(11):1513.
- Faheed, F; Mazen, A; Abd-Elmohsen, S. 2012. Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate crystal formation in some plants. *Turkish Journal of Botany* 37:139-152.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2004. Fruits of Vietnam. Regional office for Asia and the Pacific. Tailandia. 57 p.
- Franceschi, V; Horner, H. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Botanical Review* 46(4):361-427.
- French, E; Hebert, T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA). 288 p.
- Gunasena, H; Pushpakumara, D; Kariyawasam, M. 2006. Dragon fruit, *Hylocereus undatus* (Haw) Britton and Rose. In: Pushpakumara, D; Gunasena, H; Singh, V (eds.). *Underutilized fruit trees in Sri Lanka*. Sri Lanka, World Agroforestry Centre. p. 110-141.
- Hall, T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hassan, W; Haleem, R; Hassan, P. 2011. Effect of heat-stress predisposition on the development of sooty canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* Penz(Penz.) Crous & Slippers. *Acta Agrobotanica* 64(4):207-212.
- Hessen, A; Lenin, T. 1995. La pitahaya se abre paso: Cultivo exótico con potencial de exportación para las regiones tropicales de América. *Agricultura de las Américas* 44:6-10.
- IMN (Instituto Meteorológico Nacional). 2013. Datos de temperatura y precipitación del Cantón de Puntarenas. Puntarenas, Costa Rica, Estación Meteorológica de Sarmiento. 2 p.
- Lan, G; He, Z; Xi, P; Jiang, Z. 2012. First report of brown spot disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese Mainland. *Plant Disease* 96(11):1702-1703.
- Liou, M; Hung, C; Liou, R. 2000. First report of *Cactus virus X* on *Hylocereus undatus* (Cactaceae) in Taiwan. *Plant Disease* 85:229.
- Masratul, M; Baharuddin, S; Latiffah, Z. 2013. Identification and molecular characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem canker of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Journal of Phytopathology* 161(11-12):841-849.
- Masratul, M; Salleh, B; Latifah, Z. 2009. First report of *Curvularia lunata* on red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Plant Disease* 93:97.
- Masyahit, M; Sijam, K; Awang, Y; Ghazali, M. 2009a. First report on bacterial soft rot disease on dragon Fruit (*Hylocereus costaricensis*) caused by *Enterobacter cloacae* in peninsular Malaysia. *International Journal of Agriculture & Biology* 11:659-666.
- Masyahit, M; Sijam, K; Awang, Y; Ghazali, M. 2009b. The first report of the occurrence of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. on dragon fruit (*Hylocereus costaricensis*) in Peninsular Malaysia. *American Journal of Applied Sciences* 6:902-912.
- Morales, J. 2000. Orquídeas, cactus y bromelias del bosque seco de Costa Rica. Heredia, Costa Rica, Instituto Nacional de Biodiversidad. 162 p.
- Murray, M; Thompson, W. 1985. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19):4321-4325.
- OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). 2000. Manual técnico: Buenas prácticas del cultivo de la pitahaya. Nicaragua, Proyecto Vifinex. 51 p.
- Oren, A; Sadowsky, A; Gefen, D; Solel, Z; Kimchi, M. 2001. *Scybalidium* wilt of citrus. *European Journal Plant Pathology* 107:467-470.
- Palmateer, A; Ploetz, R. 2007. First occurrence of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on pitahaya. *Plant Disease* 91(5):631.
- Phillips, A; Alves, A; Abdollahzadeh, J; Slippers, B; Wingfield, M; Groenewald, J; Crous, P. 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76:51-167.
- Polizzi, G; Aiello, D; Vitale, A; Giuffrida, F; Groenewald, Z; Crous, P. 2009. First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium*

- dimidiatum* on citrus in Italy. Plant Disease (93)11:1215.
- Ray, J; Burgess, T; Lanoiselet, V. 2010. First record of *Neoscytalidium dimidiatum* Penzand *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. Australasian Plant Disease Notes 5:48-50.
- Retana, K. 2015. Diagnóstico y fluctuación estacional de las enfermedades presentes en el cultivo de la pitahaya (*Hylocereus* spp.) en Miramar, provincia de Puntarenas. Tesis M.Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 110 p.
- Reis, A; Liparini, O. 2013. Major diseases of the biofuel plant, physic nut (*Jatropha curcas*). London, United Kingdom, INTECH Chapter 3. 59-75 p.
- Rodríguez, A. 2000. Producción y comercialización de pitahayas en México. Claridades Agropecuarias 82:3-22.
- Sanahuja, G; López, P; Palmateer, J. 2016. First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Penzcausing stem and fruit canker of *Hylocereus undatus* in Florida. Plant Disease 100(7):1499.
- Slippers, B; Crous, P; Denman, S; Coutinho, T; Wingfield. B; Wingfield M. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia 96:83-101.
- Stintzing, F; Schieber, A; Reinhold, C. 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. European Food Research and Technology 212:396-407.
- Strack, D; Vogt, T; Schliemann, W. 2003. Recent advances in betalain research. Phytochemistry 62:247-269.
- Taba, S; Miyahira, N; Nasu, K; Takushi, T; Moromizato, Z. 2007. Fruit rot of strawberry pear (pitaya) caused by *Bipolaris cactivora*. Journal of General Plant Pathology 73:374-376.
- Valencia, A; Sandoval, S; Cardenas, E. 2004. A new spot disease of pitahaya (*Hylocereus undatus* Haw. Britton and Rose) caused by Fusicocum.like anamorph of *Botryosphaeria dothidea* (Moug. Fr.) in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 22(1):140-142.
- Webb, M. 1999. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. The Plant Cell 11:751-761.
- White, T; Bruns, T; Lee, S; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. In Innis, M; Gelfand, D; Sninsky, J; White, T (eds.). Academic Press. p. 315-322.
- Wright, E; Rivera, M; Ghirlanda, A. 2007. Basal rot of *Hylocereus undatus* caused by *Fusarium oxysporum* in Buenos Aires. Plant Disease 91(3):323.
- Wybraniec, S; Plazner, I; Geresh, S; Gotlieb, M; Haimberg, M; Mogilnitzki, M; Mizrahi, Y. 2001. Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. Phytochemistry 58:1208-1212.



