



**EVALUACIÓN Y POSIBLE CONTROL BIOLÓGICO DE LOS PATÓGENOS  
CAUSANTES DE LAS ENFERMEDADES "SECADERA" Y "ROÑA" EN  
CULTIVOS DE *Passiflora edulis* EN UNA FINCA DE PACHO,  
CUNDINAMARCA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTA D.C.  
MARZO, 2020**



**EVALUACIÓN Y POSIBLE CONTROL BIOLÓGICO DE LOS PATÓGENOS  
CAUSANTES DE LAS ENFERMEDADES "SECADERA" Y "ROÑA" EN  
CULTIVOS DE *Passiflora edulis* EN UNA FINCA DE PACHO,  
CUNDINAMARCA**

**MARIA PAULA ARIZA PEDROZA  
PAULA ANDREA SALAZAR TRIANA**

**LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ, Msc  
Asesora interna**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTA D.C.  
MARZO, 2020**



**EVALUACIÓN Y POSIBLE CONTROL BIOLÓGICO DE LOS PATÓGENOS  
CAUSANTES DE LAS ENFERMEDADES "SECADERA" Y "ROÑA" EN  
CULTIVOS DE *Passiflora edulis* EN UNA FINCA DE PACHO,  
CUNDINAMARCA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTA D.C.  
MARZO, 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

Las autoras del presente trabajo de grado, manifiestan sinceros agradecimientos a:

A Dios por su amor y su bondad. A nuestros padres por darnos las fuerzas necesarias y más, para empezar, continuar y terminar este proyecto pese a los diferentes obstáculos que hubo en el camino, los cuales nos ayudaron a formarnos profesional y personalmente.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por la formación profesional a lo largo de estos años y darnos las herramientas para hacer posible la culminación de este trabajo

Al agricultor Carlos Gómez, por abrirnos las puertas de su casa y darnos la oportunidad de obtener las muestras del cultivo utilizadas para el desarrollo del proyecto.

Al grupo de investigación *Neonature* de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por hacernos parte de su línea de trabajo y brindarnos la ayuda necesaria para el desarrollo de los diferentes experimentos realizados.

A nuestra asesora de trabajo de grado, Ligia Consuelo Sánchez Leal, por guiarnos en el desarrollo del mismo, por su paciencia, por su ayuda, por su comprensión y sobre todo por el aporte valioso en nuestra formación académica y personal.

A la Doctora Martha Lucía Posada Buitrago, quien con su generoso aporte de conocimiento y sabiduría nos acompañó durante todo el proceso de biología molecular y nos brindó un apoyo incondicional en la culminación del proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Introducción	1
Objetivos	3
1. Antecedentes	4
2. Marco referencial	10
2.1 Generalidades de las pasifloras	10
2.2 Taxonomía	10
2.3 Producción en Colombia	11
2.4 Maracuyá ( <i>Passiflora edulis</i> )	11
2.5 Ciclo fenológico	12
2.6 Condiciones de crecimiento	13
2.7 Cosecha	14
2.8 Principales enfermedades y plagas que afectan el cultivo de Maracuyá	15
2.9 Secadera o Fusariosis	16
2.10 <i>Fusarium</i> sp.	17
2.11 Roña	18
2.12 <i>Cladosporium</i> sp.	19
2.13 Antagonismo	19
2.14 Control Biológico	19
3. Diseño metodológico	20
3.1. Universo	20
3.2. Población	20
3.3 Muestra	20
3.4 Hipótesis	21
3.5 Tipo de investigación	21
3.6 Variables	21
3.6.1 Variable dependiente	21
3.6.2 Variable independiente	22
3.7 Indicadores	22

3.8. Técnicas y procedimientos.	23
4. Resultados	33
5. Discusión	53
6. Conclusiones	61
Recomendaciones	61
Bibliografía	62
Anexos	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> <i>Passiflora edulis</i> , Maracuyá	12
<b>Figura 2.</b> Fenología de la planta de maracuyá	13
<b>Figura 3.</b> Elementos nutricionales del cultivo del Maracuyá.	14
<b>Figura 4.</b> Enfermedad de fusariosis en cultivos de maracuyá en la finca Patio bonito, Pacho Cundinamarca	17
<b>Figura 5.</b> Verrugosis en maracuyá	18
<b>Figura 6.</b> A. Sintomatología de fusariosis en cultivo de <i>P. edulis</i> B. Cultivo de <i>P. edulis</i> afectado el 100% por fusariosis. C y D. Maracuyá afectado	24
<b>Figura 7</b> A. Toma de muestra de suelo en la finca “Patio Bonito” en Pacho- Cundinamarca de un cultivo de maracuyá. B. Cultivo afectado de maracuyá por Fusariosis y C. Muestras recolectadas de suelo y material vegetal representativos para el estudio.	26
<b>Figura 8</b> A. Preparación de las diluciones seriadas en las muestras de suelo. B. Lavado de la cámara húmeda con abundante agua y jabón, posteriormente hipoclorito al 0,5%, agua destilada estéril y etanol al 75%. C. Lavados del material vegetal en hipoclorito al 0,5%, agua destilada estéril y etanol al 75% para garantizar el crecimiento del agente patógeno y no un contaminante. D. Material vegetal limpio	27
<b>Figura 9</b> Pruebas bioquímicas en tubo realizadas en el estudio como identificación bacteriana	28
<b>Figura 10</b> Quick DNA™ Universal Kit 04068 utilizado para extracción de ADN	30
<b>Figura 11</b> Electroforesis realizada en la UCMC	31
<b>Figura 12.</b> Trace editor de secuencias ruido	32
<b>Figura 13.</b> Acceso a la base de datos BLAST	32
<b>Figura 14.</b> Alineación de nucleótidos por medio <i>ClustalW</i>	33
<b>Figura 15.</b> Bacilos Gram negativos	35

<b>Figura 16.</b> Bacilos Gram negativos	35
<b>Figura 17.</b> Bacilos Gram negativos cortos	35
<b>Figura 18.</b> Cocos Gram positivos	35
<b>Figura 19.</b> Bacilos Gram negativos cortos	36
<b>Figura 20.</b> Cocos Gram negativos	36
<b>Figura 21</b> Bacilos Gram negativos alargados	36
<b>Figura 22.</b> Bacilos Gram negativos	36
<b>Figura 23.</b> Bacilos Gram negativos	36
<b>Figura 24.</b> Bacilos Gram negativos gruesos	36
<b>Figura 25.</b> Bacilos Gram negativos	37
<b>Figura 26.</b> Bacilos Gram negativos grandes esporulados	37
<b>Figura 27.</b> Bacilos Gram negativos alargados	37
<b>Figura 28.</b> Bacilos Gram positivos alargados	37
<b>Figura 29.</b> Hongo 1	39
<b>Figura 30.</b> Hongo 2	39
<b>Figura 31.</b> Hongo 3 y 4	39
<b>Figura 32.</b> Hongo 5	39
<b>Figura 33.</b> Hongo 6	40
<b>Figura 34.</b> Hongo 7	40
<b>Figura 35.</b> Hongo 8, 9 y10	40
<b>Figura 36.</b> Hongo 11	40
<b>Figura 37.</b> Hongo 12	40
<b>Figura 38.</b> Hongo 13 y 14	41
<b>Figura 39.</b> Hongo 15	41
<b>Figura 40.</b> Hongo 17	41
<b>Figura 41.</b> Hongo 21	41
<b>Figura 42.</b> Hongo 7 azul de lacto fenol	42
<b>Figura 43.</b> Hongo 8 azul de lacto fenol	42
<b>Figura 44.</b> Hongo 9 azul de lacto fenol	42
<b>Figura 45.</b> Hongo 12 azul de lacto fenol	42
<b>Figura 46.</b> Hongo 16 azul de lacto fenol	43

<b>Figura 47.</b> Hongo 17 azul de lacto fenol	43
<b>Figura 48.</b> Hongo 21 azul de lacto fenol	43
<b>Figura 49.</b> Colonia posible patógeno por delante de la caja	44
<b>Figura 50.</b> A posible patógeno azul de lacto fenol	44
<b>Figura 51.</b> Colonia posible patógeno por detrás de la caja	44
<b>Figura 52.</b> B posible patógeno azul de lacto fenol	44
<b>Figura 53.</b> Hongo 8 tercera fase	45
<b>Figura 54.</b> Hongo 17 tercera fase	45
<b>Figura 55.</b> Hongo 21 tercera fase	45
<b>Figura 56</b> Enfrentamiento en agar PDA por el envés, patógeno H9 – Bacteria 8 A y 1 A	45
<b>Figura 57.</b> Enfrentamiento en agar nutritivo por el envés, patógeno H9 – Bacteria 8 A y 1 A	45
<b>Figura 58.</b> Enfrentamiento en agar PDA por el anverso, patógeno H9 – Bacteria 8 A y 1 A	46
<b>Figura 59.</b> Enfrentamiento en agar nutritivo por el anverso, patógeno H9 – Bacteria 8 A y 1 A	46
<b>Figura 60.</b> Enfrentamiento en agar PDA por el envés, patógeno H9 – Bacteria 3A y 8B	46
<b>Figura 61.</b> Enfrentamiento en agar nutritivo por el envés, patógeno H9 – Bacteria 3A y 8B	46
<b>Figura 62.</b> Enfrentamiento en agar PDA por el anverso, patógeno H9 – Bacteria 3A y 8B	46
<b>Figura 63.</b> Enfrentamiento en agar nutritivo por el anverso, patógeno H9 – Bacteria 3A y 8B	46
<b>Figura 64.</b> Enfrentamiento entre hongos en agar PDA por el envés, patógeno H9 – hongo H8 y H17	47
<b>Figura 65.</b> Enfrentamiento entre hongos en agar Sabouraud por el envés, patógeno H9 – hongo H8 y H17	47
<b>Figura 66</b> Enfrentamiento entre hongos en agar PDA por el anverso, patógeno H9 – hongo H8 y H17	47

<b>Figura 67.</b> Enfrentamiento entre hongos en agar Sabouraud por el anverso, patógeno H9 – hongo H8 y H17	47
<b>Figura 68.</b> Enfrentamiento entre hongos en agar Sabouraud dextrosa por el envés, patógeno H9 – hongo H21	47
<b>Figura 69.</b> Enfrentamiento entre hongos en agar Sabouraud dextrosa por el anverso, patógeno H9 – hongo H21	47
<b>Figura 70.</b> Electroforesis del hongo H9 en “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD	49
<b>Figura 71.</b> Electroforesis del H17 obtenida en “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD.	50
<b>Figura 72.</b> Electroforesis del H21 obtenida en “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD.	50
<b>Figura 73.</b> Electroforesis de la bacteria 8B obtenida en “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD.	51
<b>Figura 74.</b> Alineación secuencias de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Fusarium incarnatum</i>	53

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del género <i>Passiflora</i>	10
<b>Tabla 2.</b> Enfermedades más comunes en maracuyá	15
<b>Tabla 3.</b> Criterios de inclusión y exclusión de muestras.	20
<b>Tabla 4.</b> Indicadores	22
<b>Tabla 5.</b> Descripción de la finca e información del cultivo.	23
<b>Tabla 6.</b> Caracterización de las plantas enfermas en la finca	24
<b>Tabla 7.</b> Caracterización del muestreo	25
<b>Tabla 8</b> Preparación de la PCR para las muestras seleccionadas	30
<b>Tabla 9</b> Especificaciones de la PCR	31
<b>Tabla 10 .</b> Crecimiento de colonias en la muestra 1 de suelo	34
<b>Tabla 11.</b> Crecimiento de colonias en la muestra 2 de suelo	34
<b>Tabla 12 .</b> Crecimiento de colonias en la muestra 3 de suelo	34
<b>Tabla 13.</b> Descripción macro y microscópica de las colonias obtenidas en el aislamiento inicial en cada una de las muestras estudio.	35
<b>Tabla 14.</b> Identificación bacteriana por pruebas bioquímicas	37
<b>Tabla 15.</b> Caracterización macroscópica de los hongos obtenidos a partir del aislamiento inicial en cada una de las muestras estudio.	38
<b>Tabla 16.</b> Identificación microscópica por azul de lactofenol en los hongos seleccionados.	42
<b>Tabla 17.</b> Caracterización macroscópica y microscópica del posible patógeno aislado compatible con <i>Fusarium</i> sp.	44
<b>Tabla 18.</b> Hongos seleccionados para enfrentamientos descritos microscópicamente	45
<b>Tabla 19.</b> Pruebas de enfrentamientos	45
<b>Tabla 20.</b> Diámetro de crecimiento del patógeno frente al posible biocontrolador	48
<b>Tabla 21.</b> Resultados obtenidos a partir de la base de datos blast	52



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**EVALUACIÓN Y POSIBLE CONTROL BIOLÓGICO DE LOS PATÓGENOS  
CAUSANTES DE LAS ENFERMEDADES "SECADERA" Y "ROÑA" EN  
CULTIVOS DE *Passiflora edulis* EN UNA FINCA DE PACHO,  
CUNDINAMARCA**

**RESUMEN**

La variedad *Passiflora* está ligada a un factor económico relevante para Colombia. Las principales enfermedades que atacan el cultivo de maracuyá son producidas por los hongos *Fusarium* y *Cladosporium*, se conocen como "Secadera" y "Roña", obstruyen los haces vasculares, clorosis leve, defoliación y pudrición de raíz. El objetivo principal de este estudio fue determinar los microorganismos causantes de estas enfermedades en un cultivo de maracuyá de una Finca de Pacho Cundinamarca y los posibles controladores biológicos. Se realizó la toma de muestras de suelo y material vegetal que presentaba sintomatología compatible con las enfermedades, aislamientos primarios y secundarios, identificación fenotípica mediante características macroscópicas y microscópicas, pruebas de enfrentamiento dual para evaluar la actividad antagónica de los microorganismos previamente seleccionados e identificación con pruebas moleculares. Los resultados evidenciaron que *Fusarium oxysporum* con homología del 100% es el

patógeno primario causante de la sintomatología presentada en los cultivos de maracuyá en la finca “Patio Bonito” de Pacho, Cundinamarca. En cuanto al microorganismo causante de roña, no se obtuvo ninguna cepa compatible con el género *Cladosporium* spp. Las pruebas de antagonismo demostraron que *Serratia marcescens* y *Trichosporon porosum* poseen la capacidad de controlar *in vitro* el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. Adicionalmente, se aisló *Fusarium incarnatum*, con una homología del 99.80%, un hongo poco común en pasifloras. Este es el segundo estudio reportado con presencia de *Fusarium incarnatum* en cultivos de maracuyá en Colombia. Se espera profundizar a futuro mediante pruebas en campo.

**Palabras clave:** *Passiflora edulis*, hongos fitopatógenos, *Fusarium* spp, *Cladosporium* spp, antagonismo, control biológico.

## Introducción

El género *Passiflora* comprende una variedad de árboles frutales de importancia a nivel agrícola, que están ligados a un factor económico relevante para el país; tanto así, que existe una cadena productiva de pasifloras. Las pasifloras o *passion fruits* (frutas de la pasión), cultivadas para fin comercial y de exportación en Colombia son: maracuyá (*Passiflora edulis*), granadilla (*P. ligularis Juss*) y gulupa (*P. pinnatistipula*); y de manera artesanal, badea (*P. quadrangularis* L.) y curuba (*P. mollissima* Bailey). De acuerdo con datos facilitados por la Federación Colombiana de Productores de Pasifloras (Fedepasifloras), la producción se centra en 24 departamentos donde el maracuyá sobresale por mayor cubrimiento a nivel departamental. Para el año 2017, se estimaron 21.164 hectáreas cultivadas con más de 5000 productores de pasifloras a nivel nacional, para este caso específico *Passiflora edulis* (maracuyá), se caracteriza por tener productores con áreas superiores a una hectárea <sup>15</sup>.

El maracuyá, más conocido como la fruta de la pasión o pasionaria, se caracteriza por su alta prevalencia en países del continente latinoamericano, en especial Brasil y Colombia, y, por su alta demanda, ha llegado a ser una de las frutas más importantes por la vinculación obtenida a partir de la agroindustria y la exportación, según un reporte realizado por el ICA en el año 2017 <sup>21</sup>.

Una de las cualidades principales de esta fruta está dada por sus propiedades nutricionales, contiene un alto contenido en ácido con un pH de 3.2, debido al predominio de ácido cítrico y ácido málico. Proporciona una buena fuente de nutrientes como la vitamina A, B2 y C y fitoquímicos, carotenoides y polifenoles no nutritivos; también es rico en minerales como K, P, Ca, Fe, Na, Mg, S, Cl y proteínas <sup>23</sup>.

En Colombia, las zonas con mayor producción de pasifloras a partir del año 2004 a la fecha son Cundinamarca, Antioquia, Tolima, Huila, Cauca y Nariño. Según datos del DANE, el departamento de Huila es el mayor productor de pasifloras a nivel nacional con 3.618 hectáreas, con una alta producción de maracuyá,

granadilla y chulupa<sup>19</sup>. Este cultivo es altamente susceptible al ataque de más de 15 enfermedades, que pueden llegar a causar afectaciones generales o localizadas a la planta, ligados a patógenos como bacterias, hongos, virus, nematodos y artrópodos<sup>19</sup>.

A nivel nacional, el cultivo de maracuyá tiene un problema fitosanitario reconocido como "la secadera o fusariosis". Es una enfermedad vascular que genera gran impacto por la pérdida en la producción. La secadera es causada generalmente por especies del género *Fusarium* sp. y se caracteriza por obstrucción de haces vasculares, clorosis foliar leve, posterior defoliación y pudrición a nivel radical y ocasionar muerte prematura de la planta por marchitez<sup>10</sup>. Otra enfermedad de alta importancia es "la roña o verrugosis", causada por *Cladosporium* sp, que se caracteriza por atacar los tejidos tiernos; presenta síntomas en las hojas y frutos como lesiones circulares amarillas y posteriormente formación de verrugas, que causan el deterioro de su apariencia y por consiguiente la disminución del valor comercial de la fruta<sup>9</sup>.

El presente estudio se llevó a cabo en la finca "Patio Bonito", en el municipio de Pacho, Cundinamarca, donde se encontró que aproximadamente el 20% de las plantas de maracuyá presentaban sintomatología compatible con una o las dos enfermedades descritas, y que ha causado pérdidas de producción y bajo rendimiento del cultivo. El objetivo fue determinar los posibles microorganismos causantes de estas enfermedades en un cultivo de maracuyá ubicado en una finca de Pacho, Cundinamarca, así como la identificación de los posibles microorganismos antagonistas que puedan ser usados como controladores biológicos, como parte de un Manejo Integrado de Plagas que hacen a su cultivo. Esta evaluación se propuso verificar, si este problema es causado por los hongos mencionados y contribuir al agricultor en el conocimiento sobre su situación fitosanitaria, para tratar de disminuir pérdidas de producción al agricultor y ofrecer una opción viable de mitigación relativamente económica que no afecte la salud de personas cercanas al cultivo, no limite la acción de la microbiota nativa del suelo y al mismo tiempo sea adecuada para el medio ambiente.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar los microorganismos causantes de estas enfermedades en un cultivo de maracuyá ubicado en una finca de Pacho, Cundinamarca, al igual que la identificación de posibles microorganismos antagonistas que puedan ser usados como controladores biológicos, como parte de un manejo integrado de plagas que hacen a su cultivo.

### **Objetivos específicos**

- Aislar los microorganismos que se encuentran presentes en las muestras de suelo rizosférico y filósfera, recolectadas del cultivo de maracuyá proveniente de un cultivo del municipio de Pacho, Cundinamarca.
- Caracterizar los patógenos que están causando las enfermedades del cultivo de maracuyá conocidas como secadera o fusariosis y roña o verrugosis, a partir de las muestras obtenidas de plantas con síntomas de una finca en Pacho, Cundinamarca.
- Establecer con pruebas de antagonismo *in vitro* a partir de los microorganismos aislados, su comportamiento como posibles controladores biológicos frente a los hongos obtenidos de las muestras que producen fusariosis y verrugosis.
- Identificar genótipicamente los microorganismos patógenos y los mejores antagonistas obtenidos a partir de las muestras de suelo rizósferico y filósfera del cultivo de maracuyá proveniente de un cultivo del municipio de Pacho, Cundinamarca.

## 1. Antecedentes

La disminución del rendimiento en la producción de fruta en las plantas del género *passiflora* se ha convertido en una de las mayores preocupaciones para el gremio de agricultores del país. Por esta razón, es importante la mitigación de los patógenos que puedan llegar a generar la mortalidad total de los cultivos ya que, alrededor de 24 departamentos como Huila, Tolima, Meta, Boyacá y Cundinamarca, Antioquia, Caldas, Quindío, Risaralda Cauca y Nariño son productores y se verían favorecidos con el cultivo de estas frutas en especial de la *Passiflora edulis*, más conocida como Maracuyá.

El año 2009 se realizó una investigación enfocada en las generalidades de cultivo de *Passiflora edulis* (Maracuyá), también conocida como "La fruta de la pasión". Amata<sup>1</sup> et al, consideraron este fruto particularmente rico en minerales y vitaminas A, C y D. Adicionalmente, refieren que su consumo conducirá a una mejor salud y estado nutricional, particularmente en grupos vulnerables como los niños, los ancianos y personas infectadas con VIH / SIDA. Con esta premisa, es importante que el fruto se encuentre en perfectas condiciones de sanidad, lo que depende desde el principio de la siembra y durante todo su desarrollo hasta la cosecha. Sin embargo, la existencia de problemas fitosanitarios (en su mayoría fúngicos) trae consecuencias para la producción. Más adelante, en 2011 Amata et al<sup>3</sup>, realizaron un estudio de estos problemas fitosanitarios que afectan la producción de pasifloras y refirieron que las enfermedades causan pérdidas de rendimiento del 80-100% en los sistemas de producción de maracuyá. En su mayoría, son enfermedades de procedencia fúngica, las cuales atacan y perjudican los cultivos propagándose rápidamente; los síntomas fueron similares en todas las plantas de pasifloras, y por lo tanto se determinó que la enfermedad era fusariosis. Adicionalmente, los investigadores sostienen que los agricultores no adoptan medidas de saneamiento en el campo que reduzcan como tal la enfermedad, como la poda, la quema de partes de plantas infectadas y la desinfección de las herramientas utilizadas en las granjas. Se considera, que tales medidas podrían reducir la reproducción del patógeno.

Dentro de los problemas fitosanitarios que afectan a las pasifloras, también se encuentra la roña o verrugosis, la cual es una enfermedad que afecta estos cultivos (familia Passifloraceae). Según Delgado et al<sup>4</sup> en 2012, describieron que el manejo de la misma es ineficiente, debido al poco conocimiento que se tiene. Este trabajo estuvo orientado a identificar la susceptibilidad del maracuyá a la roña por medio de métodos de inoculación como: aspersión con y sin heridas de *Cladosporium cladosporioides* y se determinó que la susceptibilidad a la Roña fue entre una y tres semanas de edad. Esto significa que se deben tomar medidas preventivas de manejo de esta enfermedad, porque trae grandes consecuencias para los cultivos y evidentemente para la cosecha<sup>4</sup>. La producción de maracuyá es de gran importancia económica para el país, puesto que ocupa un lugar valioso en la explotación frutícola. Según Quiroga et al<sup>5</sup>, en el artículo *Microorganismos rizosféricos, potenciales antagonistas de Fusarium sp. causante de la pudrición radicular de maracuyá (Passiflora edulis Sims)*, el departamento de mayor producción es Huila con un área sembrada de 1635 ha; sin embargo, la problemática fitosanitaria en el cultivo es el marchitamiento vascular conocido como secadera o muerte descendente de la planta ocasionado por *Fusarium spp.* Esta enfermedad se caracteriza por el amarillamiento parcial de las hojas, enanismo de los brotes, disminución del crecimiento de la planta y por lo tanto pérdida total de la producción. El manejo de este patógeno es considerablemente complicado puesto que, al utilizar controles químicos de amplio espectro como los fungicidas, han llevado a que se presenten cepas de *Fusarium sp* resistentes, efectos negativos en la salud pública y el medio ambiente. Por lo tanto, se propuso plantear el uso de estrategias de control biológico, importantes para la recuperación del equilibrio de los agroecosistemas y para el aprovechamiento del potencial antagonista natural de ciertos microorganismos como hongos y rizobacterias contra patógenos vulnerables.

En el mismo año, Ocampo et al<sup>6</sup>, realizaron un estudio basado en la exploración de la variabilidad genética del maracuyá con el objetivo de realizar un programa de

fitomejoramiento en los cultivos aquí en Colombia. Se analizaron las generalidades del cultivo y los patógenos de mayor incidencia. Encontraron que estaba presente *Cladosporium* sp. y *Fusarium* sp., responsables de las enfermedades de la roña y la secadera respectivamente; se analizó, además, el estado fisicoquímico del fruto, clasificación, características de los cultivos, variabilidad genética y fitomejoramiento. Se concluyó que las enfermedades más graves fueron la virosis (50%) y la roña (34%), donde el alto porcentaje de enfermedades, posiblemente, se relaciona con la falta de control de arvenses hospederas, uso excesivo de agroquímicos o condiciones genéticas de los cultivos a causa de la endogamia, lo que impide solucionar estos problemas fitosanitarios mediante la introducción de genes de resistencia.

En un estudio realizado sobre la caracterización de la enfermedad de la Roña en cultivos de maracuyá, a partir de 40 muestras pertenecientes a diferentes departamentos de Colombia en el año 2013 Delgado et al<sup>7</sup>, quisieron determinar la verdadera etiología de la enfermedad, realizando pruebas de patogenicidad y caracterización patológica del agente causante. Se hizo, además, la caracterización molecular de dicho patógeno por medio de la amplificación de las regiones ITS (intern transcribed space) del ADN ribosomal y del gen Actin, enzimas de restricción y secuenciación. Se encontró que el hongo encontrado que podría ser causante de la Roña era el hongo de la especie *Cladosporium cladosporioides*.

En Brasil Do Santos A<sup>8</sup>, realizó un estudio cuyo objetivo fue caracterizar la resistencia de 31 genotipos de maracuyá (*Passiflora* sp.) *Fusarium oxysporum* sp. *passiflorae* (FOP). Du Santos et al., inocularon 20 plántulas de cada genotipo, evaluando diariamente durante 120 días, con el fin de detectar la aparición de síntomas de marchitamiento y muerte. Estos datos se utilizaron para calcular el área bajo la curva de progreso de la enfermedad, para el análisis de supervivencia y agrupación. Los genotipos fueron clasificados en cuatro subgrupos: resistente, moderadamente resistente, susceptible y altamente susceptible. La resistencia fue

dependiente del genotipo, pero no se encontró una variación significativa entre el púrpura y el amarillo de *Passiflora edulis*. Concluyeron que la mayoría de las plantas tienen la maquinaria genética para defenderse; la susceptibilidad de las plantas es el resultado de su incapacidad para detectar rápidamente la presencia del patógeno o la falta de un gen importante para la resistencia.

En el mismo año 2013, Granobles et al<sup>9</sup>, con la colaboración de la universidad del Valle, realizaron un estudio donde evaluaron el efecto de biocontroladores sobre la dinámica poblacional de hongos de suelo en un cultivo de maracuyá, tomando como referencia, la ola invernal del 2010, la cual pudo haber causado un cambio en la composición poblacional de hongos patógenos asociados al cultivo de Maracuyá, debido a las condiciones ambientales del suelo. Esta investigación se encaminó a determinar, cómo la dinámica de las poblaciones de hongos varía con respecto a diferentes tratamientos y a condiciones climáticas. Se comparó la diversidad, abundancia y riqueza de hongos del suelo, en parcelas de tierras con una mezcla de *Trichoderma harzianum* - *Bacillus subtilis*, manejo convencional con fertilizantes:  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$  y FOSS 61 y la mezcla: DAP, Triple 15 y KCL, Las cepas aisladas y se caracterizaron morfológicamente a través de claves taxonómicas. No se evidenciaron diferencias significativas en diversidad, abundancia y riqueza. Las especies de *Trichoderma* no le dieron actividad biocontroladora, pero su presencia en el suelo participa en la biotransformación de los agroquímicos utilizados, restaurando los suelos. Por su parte *Bacillus subtilis*, presentó actividad antibiótica sobre los hongos patógenos aislados del suelo, confirmándose su actividad como biocontrolador.

En el año 2014, Ortiz et al<sup>10</sup>, determinaron por medio de muestras de tejido procesado de plantas de maracuyá púrpura las afectaciones correspondientes a dos de los microorganismos fitopatógenos encontrados en Colombia, el *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Las muestras fueron obtenidas de un cultivo de nueve meses infectado naturalmente, en el área de Venecia (Cundinamarca, Colombia). Como resultados, se obtuvo que la colonización por *F. oxysporum* se

observó en todos los órganos de las plantas de maracuyá púrpura analizadas (raíz, tallo y collar). Este hallazgo corrobora la capacidad informada del patógeno para penetrar el sistema radicular y colonizar la planta a través de su sistema vascular; sin embargo, no hubo evidencia de estructuras fúngicas en el tejido del tallo infectado naturalmente con *F. solani*. Este hallazgo apoya la idea de que este patógeno tiende a localizarse en el collar y que está asociado con síntomas previamente observados en el cultivo. En las lesiones causadas por los patógenos *F. oxysporum* y *F. solani*, las hifas y los microconidios son evidentes en la luz de los vasos, así como en la formación de geles, que constituye una respuesta de defensa de las plantas infectadas.

Ferreira et al<sup>11</sup>, en el año 2015, publicaron un estudio catalogado “*Residuos orgánicos en el control de Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae en maracuyá amarillo (Passiflora edulis)*”, en el cual evaluaron el efecto de residuos orgánicos *in vitro* e *in vivo* como medida alternativa para el manejo de la fusariosis en maracuyá, generada por *Fusarium oxysporum*. Se evaluaron seis concentraciones *in vitro* en forma de extracto acuoso, e igual número, para la inhibición del crecimiento micelial *in vivo*, los cuales fueron incorporados al suelo para el control de *Fusarium*. Como fuente residual se utilizaron hojas de eucalipto, bagazo de coco babasú y cáscara de yuca; el bagazo babasú, presentó las mayores concentraciones de N, P y K. Se concluye que el residuo de eucalipto no influyó en el desarrollo de la mancha de *Fusarium* de maracuyá en vivero y que *in vitro*, los 3 residuos presentaron inhibiciones significativas en las primeras concentraciones, lo que permite establecer que utilizar residuos orgánicos para el control de *Fusarium* en el cultivo de maracuyá amarillo, es considerado como una opción viable.

En 2017, Robledo et al<sup>12</sup>, en el artículo “Microscopía electrónica de barrido ambiental del proceso de infección de *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae* en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis*)”, estudiaron la pudrición del collar de maracuyá, por microscopía electrónica mediante inoculaciones del patógeno

aislado y colocado en la superficie del collar de la planta, cada 24 horas durante 7 días. El resultado obtenido fue la evidencia de conidios y micelios septados densos sobre la epidermis del tallo y el collar; adicionalmente, se encontró hipertrofia y degradación de la pared celular de los tejidos vasculares durante este período.

En el año 2018, Ángel et al<sup>13</sup>, en su estudio *Comparación de métodos de inoculación de Fusarium solani f. sp. Passiflorae en plántulas de maracuyá (Passiflora edulis)*, cotejaron cuatro métodos de inoculación de *Fusarium solani* en plántulas de maracuyá, con el fin de entender un método de inoculación eficiente para evaluar germoplasma de maracuyá contra este patógeno. En el experimento los tratamientos fueron: incisión en el tallo, inmersión de raíces, inyección en el tallo y cribado en tubos de ensayo modificado. El patógeno infectó raíces, tallo y hojas, causando estrangulamiento ascendente y descendente del tallo; además, se determinó que los tratamientos con 100% de la enfermedad fueron los de incisión en tallo y el cribado. Se concluyó que los métodos más eficientes para inocular *Fusarium* sp. en plántulas de maracuyá, fueron el cribado en tubos de ensayo modificado y la incisión en el tallo, debido a la homogeneidad en los resultados y su reproducibilidad.

En el estudio de Henao et al<sup>14</sup>, se utilizaron técnicas moleculares para hacer comparaciones de pequeñas secuencias de ADN de regiones altamente conservadas, en la identificación molecular de hongos. En el caso del género *Fusarium* se presenta un alto nivel de polimorfismos entre especies estrechamente relacionadas y la clasificación taxonómica ha sido ampliamente discutida ya que por sus caracteres morfológicos resultan ser insuficientes para una correcta identificación a nivel de especie. De 35 muestras de tejido vegetal recolectadas en el Valle del Cauca, Colombia, se obtuvieron ocho aislamientos del género *Fusarium*. La caracterización molecular de los ocho aislamientos permitió identificar tres especies: *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium solani*; donde la primera fue la de mayor incidencia en las muestras evaluadas.

## 2. Marco referencial

### 2.1 Generalidades de las pasifloras

La familia Passifloraceae se clasifica en 17 géneros y aproximadamente 600 especies, el cultivo se realiza en regiones tropicales y subtropicales. La mayoría de estas especies, están distribuidas principalmente en América Tropical y 23 de estas especies crecen en el sur de Asia y Oceanía<sup>16</sup>. Etimológicamente, el término *passiflora* viene del latín *passio*, que significa pasión, y *flos*, que traduce flores; dándose aquí el término flor de la pasión o fruta de la pasión, que tiene que ver con la similitud con la corona de Cristo. Entre las especies cultivadas del género *Passiflora* se encuentran maracuyá (*P. edulis* var. *flavicarpa*), granadilla (*P. ligularis*), gulupa (*P. edulis* var. *edulis*), curuba de Castilla (*P. mollissima*), badea (*P. quadrangularis*) y cholupa (*P. maliformis*)<sup>17</sup>.

### 2.2 Taxonomía

En la tabla 1, se presenta la taxonomía del género *Passiflora* tomado de USDA United States Department of Agriculture<sup>18</sup>

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>PASSIFLORA</i>	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Violales
Familia	Passifloraceae
Tribu	Passiflorae
Género	<i>Passiflora</i>

### **2.3 Producción en Colombia**

En Colombia, las zonas con mayor producción de pasifloras a partir del año 2004 a la fecha son Cundinamarca, Antioquia, Tolima, Huila, Cauca y Nariño. Según datos del DANE, el departamento de Huila es el mayor productor de pasifloras a nivel nacional con 3.618 hectáreas, con una alta producción de maracuyá, granadilla y chulupa<sup>19</sup>. Según el informe entregado por Agronet en el año 2016, el área total sembrada en maracuyá fue de 7.192 ha, con una producción de 119.388 toneladas y un rendimiento de 14,85 ton/ha<sup>19</sup>.

Para el año 2017, el viceministro de asuntos agropecuarios, Juan Pablo Pineda, informó que las exportaciones de pasifloras aumentaron un 20%, al pasar de 4.908 toneladas en 2014 a 7.925 toneladas en 2016, dándole paso a la disminución de importaciones reemplazadas por producción nacional; en el periodo 2014 - 2016, se destaca el aumento de la producción que llegó a 180.241 toneladas, en un área de 15.301 hectáreas<sup>20</sup>.

### **2.4 Maracuyá (*Passiflora edulis*)**

Conocida como la fruta de la pasión o pasionaria, el maracuyá se caracteriza por su alta prevalencia en países del continente latinoamericano como Brasil y Colombia; por su alta demanda, ha llegado a ser una de las frutas más importantes por su vínculo con la agroindustria y la exportación.

Los cultivos de maracuyá son encontrados en altitudes que van desde los 0 hasta los 1300 msnm, poseen una raíz la cual es poco profunda adicionalmente raíces secundarias y terciarias superficiales; las hojas por lo general tienen 3 lóbulos, son palmeadas y no poseen vellosidades<sup>21</sup>. Las flores son solitarias y axilares, poseen 5 pétalos con 5 estambres, por último, el fruto es redondo u ovoide, de color amarillo y en algunos casos morado, con un diámetro de 5 a 7 cm; con un endocarpio de color blanco, donde en el interior de la fruta se encuentra la pulpa<sup>21</sup>.

Una de las cualidades principales de esta fruta está dada por sus propiedades nutricionales, posee un pH de 3.2 debido al predominio de ácido cítrico y ácido málico. Adicionalmente, proporciona una buena fuente de nutrientes como la vitamina A, B2 y C y fitoquímicos, carotenoides y polifenoles no nutritivos; también es rico en minerales como K, P, Ca, Fe, Na, Mg, S, Cl y proteínas. Por otro lado se dice que *P. edulis* contiene diferentes propiedades como: Antiinflamatorias, anticonvulsivas, antimicrobianas, anticancerígenas, antidiabéticas, antihipertensivas, anti sedantes, antioxidantes y se usa en medidas correctivas para tratar distintas enfermedades <sup>23</sup>.



**Figura. 1.** *Passiflora edulis*, Maracuyá tomado de: Agroagricultor, propiedades nutricionales del maracuyá<sup>22</sup>

## 2.5 Ciclo fenológico

En condiciones óptimas, el desarrollo del cultivo de maracuyá consta de tres etapas que completan un tiempo total de 20 meses. Inicialmente se encuentra la germinación de la semilla, también puede ser propagado por estaca, acodo e injerto<sup>21</sup>. El método más usado es por semilla las cuales se colocan a un centímetro de profundidad<sup>26</sup>. Luego viene la etapa reproductiva que comienza desde la floración hasta la formación de los frutos, y por último en la etapa

productiva, la cual da inicio a la formación del fruto hasta la cosecha, esta etapa se considera que contempla la vida útil del cultivo que se encuentra entre dos y tres años<sup>24</sup>. En la figura 2 se puede evidenciar el ciclo fenológico y el tiempo de cada una de las etapas descritas.



**Figura. 2.** Fenología de la planta de maracuyá tomado de: Manual de cultivo de maracuyá bajo buenas prácticas agrícolas <sup>24</sup>

## 2.6 Condiciones de crecimiento

En cuanto a las condiciones de crecimiento del cultivo, generalmente se amarra el tallo debajo de una hoja de la planta con el extremo de una pita y el otro extremo se amarra al alambre de la espaldera, de esta forma la planta irá creciendo de manera correcta.<sup>27</sup> Para lograr un cultivo con crecimiento óptimo, es importante llevar a cabo un manejo adecuado y constante de la plantación, durante el primer año las podas son necesarias, en el segundo año se podan las ramas que ya dieron fruto y se despuntan ramas principales para mejorar ventilación en el cultivo<sup>25</sup>.

Con respecto al logro de una producción eficiente, es recomendable tener diferentes planes de fertilización que garanticen la nutrición del cultivo. El cual se puede basar por un análisis previo de suelos, realizado antes de la siembra. La fertilización se debe hacer con una frecuencia mensual o bimensual en dosis moderadas<sup>25</sup>. En la figura 3 se presentan los elementos nutricionales para el cultivo de maracuyá.

Elemento	Planta Entera	Frutos	
		Cantidad	%
MACRONUTRIENTES			
Nitrógeno (Kg)	205.5	44.55	21.68
Fósforo (Kg)	17.4	6.9	39.66
Potasio (Kg)	184.2	73.8	40.07
Calcio (Kg)	151.65	6.75	4.45
Magnesio (Kg)	14.4	4.05	28.13
Azufre (Kg)	25.05	4.05	16.17
MICRONUTRIENTES			
Boro (gr)	295.8	37.8	12.78
Cobre (gr)	198.75	64.05	32.23
Hierro (gr)	770.4	88.05	11.43
Manganeso (gr)	2810.25	180.15	6.41
Zinc (gr)	316.95	108.15	34.12

**Figura 3.** Elementos nutricionales del cultivo del Maracuyá. Tomado de: Cultivo de maracuyá <sup>25</sup>

## 2.7 Cosecha

Al tercer año, el cultivo permite obtener cosechas con cualidades óptimas. Los meses con la mejor producción son mayo y junio, puesto que, los frutos alcanzan su madurez entre los 50-60 días después de la floración. El fruto por su parte toma una coloración verde-amarilla, 20 días después de obtener este color, cae y comienza a envejecer, disminuyendo su peso, acidez y azúcares totales<sup>24</sup>.

La recolección es definida como el desprendimiento de los frutos de la planta con la madurez comercial necesaria, por lo general se recomienda realizarse manualmente, para esto es necesario el uso de tijeras o también se puede doblar el pedúnculo con ayuda de los dedos, a la altura del segundo nudo, de esta forma la fruta queda aproximadamente con dos centímetros de pedúnculo, evitando el ataque de hongos y pérdida de peso. En el caso de los frutos que tengan daños externos ya sea por causa de insectos, enfermedades, daño mecánico, ambiental u otro, se deben recolectar aparte para evitar contaminación de los frutos sanos. <sup>24</sup>

## 2.8 Principales enfermedades y plagas que afectan el cultivo de Maracuyá

El cultivo del maracuyá es susceptible al ataque de enfermedades, lo cual ha originado la migración periódica del cultivo a diferentes zonas del país. Las

malezas dentro de los cultivos generan pérdidas en los sistemas de producción debido a la alta competencia por nutrientes, luz, agua y espacio<sup>25</sup>; estos factores aumentan la humedad relativa que favorece las condiciones de establecimiento de hongos, plagas y patógenos hospederos, generando a su vez efectos negativos como el incremento en los costos de producción, reducción del rendimiento y baja calidad de la fruta<sup>25,27</sup>.

Las enfermedades que afectan al cultivo de maracuyá son provenientes de origen fúngico, bacteriano y viral causando pudriciones radicales y en algunos casos foliares. La importancia de estas enfermedades radica en la incidencia y severidad de las mismas, en la distribución en la zona de siembra y en la época de aparición<sup>25</sup>

En la tabla 2, se observan las enfermedades más comunes en cultivos de maracuyá.

**TABLA 2. ENFERMEDADES MÁS COMUNES EN MARACUYÁ**

ENFERMEDAD	ORIGEN Y AGENTE CAUSAL	SÍNTOMAS
Antracnosis	Fúngico ( <i>Colletotrichum sp</i> )	Se producen manchas foliares de forma y tamaño variable, tiene apariencia aceitosa en los bordes con anillos desde el centro hacia afuera. En los frutos estas lesiones comienzan como manchas aceitosas que se transforman en lesiones hendidas y luego aparecen chancros de color pardo a negro donde hay crecimiento del hongo. (Orlando Quejada 2014;)
Mancha bacteriana	Bacteriano ( <i>Xanthomonas sp</i> )	Se presenta con manchas acuosas con formación de un halo clorótico y lesión parda en el centro. Cuando la lesión avanza, las manchas se tornan más grandes, abarcando toda la hoja y causando su caída. Los síntomas más fuertes se observan cuando se presentan períodos de temperatura y humedad relativa altas. (Álvarez et al; 2012)
Mancha parda	Fúngico ( <i>Alternaria sp</i> )	Se presentan manchas de color pardo rojizo en las hojas y en condiciones muy húmedas se observan márgenes acuosas; con el tiempo, las lesiones se agrandan y forman anillo. En los frutos las lesiones

son variables, manchas aceitosas seguidas de lesiones y chancros de color pardo, que cuando aumentan se ponen de color negro. (Álvarez et al; 2012)

Virosis	Viral ( <i>Tymovirus</i> , <i>Polyvirus</i> y <i>Rhabdovirus</i> )	Las plantas infestadas presentan frutos deformes, pequeños y duros, la cáscara presenta un grosor irregular, provocando una reducción en la cavidad de la pulpa. Foliarmente se manifiesta como un mosaico y deformación. (Salinas et al 2014)
---------	---	--

## 2.9 Secadera o Fusariosis

Es de las enfermedades más comunes en cultivos, se manifiesta como clorosis en las hojas, que luego pasa a un tizón foliar sistémico de color marrón claro. Estas lesiones se presentan en cualquier parte de las hojas del árbol, presentando deformación foliar, marchitamiento y finalmente defoliación por infección del pedúnculo.<sup>29</sup> Adicionalmente, los brotes tiernos también pueden ser afectados, presentando las características previamente mencionadas como deformación de las hojas pequeñas, clorosis y defoliación<sup>29</sup>. En la figura 4, se puede evidenciar el marchitamiento o pérdida total de las plantaciones en el cultivo de maracuyá de la hacienda “Patio bonito”. La fusariosis o marchitez vascular es ocasionada, en su mayoría por los hongos *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*. Estos hongos son saprófitos del suelo, los cuales también se nutren y se reproducen en la materia orgánica en descomposición del suelo y en la rizósfera de la planta<sup>30</sup>.



**Figura 4.** Enfermedad de fusariosis en cultivos de maracuyá en la finca Patio bonito, Pacho Cundinamarca. Autoras, 2019.

## **2.10 *Fusarium* sp.**

Los hongos del género *Fusarium* sp se consideran como los patógenos más agresivos que afectan plantaciones de especies comerciales del género *Passiflora*<sup>31</sup>. *Fusarium* sp, produce tres clases de esporas: Microconidias, macroconidias y clamidosporas. Se caracteriza por la producción de colonias de rápido crecimiento en agar PDA a una temperatura de 25-30°C. En cuanto a la morfología de las colonias es variable, pues depende de la especie y también puede presentar dos tipos: I) Donde se evidencia micelio aéreo, algodonoso, coloración variable de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta y pocas microconidias y II) Con formación de poco o ningún micelio aéreo con abundantes microconidias.<sup>32</sup>

## **2.11 Roña**

Conocida también como "verrugosis", es una enfermedad típica de los tejidos tiernos, aparece generalmente en los brotes y frutos pequeños (menores de 3 cm). Los síntomas principales en las hojas se manifiestan como lesiones circulares de 3-5 mm rodeadas de un halo amarillo cuando inicia la enfermedad, luego toda la lesión se vuelve de color rojizo<sup>29</sup>. En los frutos, los síntomas inician con una decoloración de los tejidos, que posteriormente se vuelven acuosos y es cuando aparecen lesiones en forma de verrugas. Internamente, el fruto no sufre daño, limitándose la enfermedad a evidenciarse en la parte externa de la cáscara<sup>29</sup>. El principal agente causal es el hongo del género *Cladosporium* spp., clasificado como hongo imperfecto; es considerado saprófito de plantas en descomposición, textiles, cuero, caucho y madera<sup>7</sup>.

*Cladosporium oxysporum* fue reportado como el agente causal de roña en Zimbabwe y Australia y *C. cladosporioides* y *C. herbarum* en Brasil; en Colombia se registró, en el año 2013, un estudio de identificación del causante principal de esta enfermedad; por medio de pruebas moleculares, se detectó *Cladosporium cladosporioides* como posible patógeno. La tasa de crecimiento y la coloración de

las cepas son variables por lo tanto se piensa en la existencia de varias especies del género *Cladosporium* causantes de Roña en el país <sup>33</sup>.



**Figura 5.** Verrugosis en maracuyá <sup>33</sup>

### **2.12 *Cladosporium* sp.**

Hongo de la clase Ascomycetes que presenta gran abundancia de esporas asexuales conocidas como conidios, las cuales son producidas en conidióforos grandes y oscuros que pueden ramificar en el ápice y, siempre están dispuestas sobre conidióforos en grupos ramificados<sup>33</sup>. *Cladosporium* spp., crece de forma moderada en agar PDA a una temperatura de 25-30 °C formando colonias aterciopeladas, harinosas, de color verde grisáceo a verde oliva, y negro en el reverso. Los conidióforos son derechos, ramificados y flocosos, a menudo forman un césped, el cual es de color oliva. Las blastosporas se encuentran de a una o dos, con forma y tamaño variables.<sup>34</sup>.

### **2.13 Antagonismo**

Todo organismo vivo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se le denomina antagonismo. Puede manifestarse en forma de antibiosis (acción directa de metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a éstos), lisis, reacciones inmunológicas, competencia, micoparasitismo y depredación. Se considera que el antagonismo

manifestado con hiperparasitismo, la antibiosis y competencia, son los más comunes y posiblemente los más eficientes. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo y en rizósfera, por las condiciones adversas que presentan estos ambientes. Los microorganismos antagonistas tienen la capacidad de producir antibióticos, los cuales actúan en competencia por nutrientes o inducen resistencia en el hospedero<sup>38</sup>. La mayoría de las plagas y organismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o enemigos naturales, que se pueden emplear como estrategia en un programa de control biológico.

## **2.14 Control biológico**

Se define como represión de insectos plaga o microorganismos que producen enfermedad, mediante sus enemigos naturales; es decir mediante la acción de predadores, parásitos y patógenos<sup>35</sup>. Entre los más conocidos están, insectos benéficos, parasitoides como bacterias, hongos, virus y nemátodos. Por ser un método racional y amigable con el medio ambiente, no deja residuos en las plantas ni en los alimentos, protegiendo la salud del agricultor y la población<sup>36</sup>. El control biológico clásico consiste en la potenciación o utilización de los enemigos naturales de una plaga para reducir su población. Esto se puede llevar a cabo introduciendo en una determinada zona o región los enemigos naturales propios del lugar de origen de la plaga (en el caso de ser una plaga introducida). También se pueden potenciar los propios enemigos naturales nativos presentes en el lugar donde la plaga se encuentra ya establecida. En un sentido restringido control biológico (o control microbiológico) es la introducción artificial de microorganismos antagonistas en un ecosistema determinado para controlar a un patógeno o una plaga<sup>37</sup>

Existen diferentes mecanismos en los que pueden operar los organismos antagonistas, estos mecanismos son la capacidad de colonización y forma de inoculación, la cual determina la cantidad de enfermedad producida y está ligado en principio a la cantidad de un microorganismo existente en un sistema a mayor cantidad más facilidad para que la planta resulte infectada por un patógeno o protegida, si se trata de un agente de biocontrol<sup>37</sup>. Y la competencia en la

colonización con los patógenos en el mismo nicho ecológico en la superficie de la planta, o competencia por nutrientes <sup>37</sup>.

### 3. Diseño metodológico.

#### 3.1 Universo

Hongos del género *Fusarium sp*, *Cladosporium sp* y microorganismos que poseen actividad antagónica con posibilidad de ser utilizados como controladores biológicos.

#### 3.2 Población

Hongos patógenos del cultivo de maracuyá y microorganismos del cultivo de maracuyá procedentes de cultivos del Maracuyá, “Patio Bonito” en la vereda Guayacán, en el municipio de Pacho, Cundinamarca.

#### 3.3 Muestra

Hongos del género *Fusarium sp* y *Cladosporium sp*, y microorganismos nativos de rizósfera y filósfera del cultivo de maracuyá con capacidad antagónica frente a *Fusarium sp* y *Cladosporium sp* u otros patógenos presentes en la finca “Patio Bonito” en la vereda Guayacán, en el municipio de Pacho, Cundinamarca.

**TABLA 3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE MUESTRAS.**

CRITERIO/ MUESTRA	FINCA	SUELO	MATERIAL VEGETAL
<b>Inclusión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tener cultivo de <i>P. edulis</i></li> <li>- Los cultivos reflejan algún tipo de sintomatología asociado a “secadera” o “roña”</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Terreno con más de un año con cultivos</li> <li>- Se evidencian problemas fitosanitarios en el cultivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frutos / hojas que presentan marchitez, verrugas o clorosis.</li> </ul>
<b>Exclusión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cultivos diferentes a <i>P. edulis</i></li> <li>-Cultivos sanos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Terreno reciente sin cultivos previos.</li> <li>- No reflejan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frutos / hojas sanas</li> </ul>

### 3.4. Hipótesis

- Las enfermedades Fusariosis y roña se encuentran con mayor frecuencia en cultivos de maracuyá (*P. edulis*), responsables del marchitamiento y pérdida del más del 20% del cultivo de la finca “Patio Bonito” en la vereda Guayacán, en el municipio de Pacho, Cundinamarca, y los patógenos que producen estas enfermedades, son hongos de los géneros *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp.
- Algunos microorganismos fúngicos y bacterianos nativos presentes en el suelo y material vegetal en el cultivo de maracuyá en la finca “Patio Bonito” en la vereda Guayacán, en el municipio de Pacho, Cundinamarca, sirven como antagonistas en el control biológico de las enfermedades producidas por hongos de los géneros *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp.

### 3.5 Tipo de investigación

Esta investigación es cuantitativa, con un enfoque descriptivo y experimental.

### 3.6 Variables

#### 3.6.1 Variable dependiente

- Plantas de maracuyá de la finca seleccionada en Pacho Cundinamarca.
- Hongos del género *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp. causantes de Fusariosis y roña en las Plantas seleccionadas.
- Microorganismos nativos de rizósfera y filósfera del cultivo de maracuyá con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp y *Cladosporium* sp presentes en una finca del municipio de Pacho, Cundinamarca.
- Medios de cultivo para aislamiento

- Pruebas bioquímicas de identificación
- Técnicas de genotipificación para identificación de microorganismos

### 3.6.2 Variable independiente

- Compatibilidad de *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp
- Capacidad antagónica de los microorganismos aislados de rizósfera y filósfera del cultivo de maracuyá
- Información genética de los microorganismos patógenos y antagonistas

### 3.6 Indicadores

TABLA 4. INDICADORES

OBJETIVOS	INDICADORES
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Aislar los microorganismos que se encuentran presentes en las muestras enfermas, suelo rizosférico y filósfera, recolectadas del cultivo de maracuyá proveniente de un cultivo del municipio de Pacho, Cundinamarca.</li> <li>● Identificar los patógenos que están causando las enfermedades del cultivo de maracuyá conocidas como secadera o fusariosis y roña o verrugosis, a partir de las muestras obtenidas de plantas con síntomas de una finca en Pacho, Cundinamarca</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Número de Microorganismos aislados patógenos y no patógenos en el cultivo de maracuyá de la finca “Patio Bonito” en la vereda Guayacán, en el municipio de Pacho, Cundinamarca.</li> <li>● Tipo de Microorganismos aislados patógenos y no patógenos, identificados por microbiología y biología molecular.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Evaluar con pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> a partir de los microorganismos aislados el comportamiento como controladores biológicos frente a los hongos obtenidos de las muestras enfermas que producen fusariosis y verrugosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Tipo de Microorganismos que tengan posible capacidad antagónica frente a los hongos del genero <i>Fusarium</i> sp. y <i>Cladosporium</i> sp.</li> </ul>

- Identificar genotípicamente los microorganismos patógenos y los mejores antagonistas obtenidos a partir de las muestras enfermas, rizósfera y filósfera del cultivo de maracuyá proveniente de un cultivo del municipio de Pacho, Cundinamarca

### 3.8. Técnicas y procedimientos.

#### Primera fase: Obtención de muestras

##### 3.8.1 Selección y recolección de muestras:

Inicialmente, se realizó un diagnóstico previo del cultivo de Maracuyá en la finca Patio Bonito, con el fin de conocer factores que pudieran tener compatibilidad con las enfermedades de importancia para el estudio. Los datos recolectados fueron:

**TABLA 5. DESCRIPCIÓN DE LA FINCA E INFORMACION DEL CULTIVO**

Datos generales del terreno		Datos generales del cultivo	
Propietario: Carlos Gómez			
Ubicación	Vereda Guayacán, Pacho- Cundinamarca	Tipo de cultivo	Maracuyá
Georreferenciación	Latitud: 5.13095, Longitud: -74.1602 5° 7' 51" Norte, 74° 9' 37" Oeste	Tiempo promedio de crecimiento	De 8 a 9 meses para la primera cosecha
Nombre de la finca	Patio bonito	Tipo de riego	Natural
Distancia desde Bogotá	3 horas + 30 minutos aproximadamente	Número de plantas cultivadas	100
Clima	Tropical seco	Cultivos anteriores	Caña, cítricos.
Altura	1.799 m	Tipo de suelo	Areno- arcilloso
Temperatura aproximada	De 12°C a 23°C	pH	7.5

Adicionalmente, con ayuda del encargado de la finca, se realizó una caracterización de las plantas que se encontraban enfermas, estudios previos, los tratamientos de uso común y se recolectaron los siguientes datos:

TABLA 6. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS ENFERMAS	
Número de plantas enfermas	Aproximadamente 20 plantas
Signos y síntomas	Marchitez, clorosis tanto en planta como en fruto, verrugosis o comúnmente “Roña”.
Estudios realizados anteriormente	Por la Universidad Nacional de Colombia
Tratamientos utilizados	Ridemil, oxiclورو de cobre, evisecti, nitrato de potasio, fosetal, edisom, cobrethane (fungicida).

Se identificaron macroscópicamente las plantas de maracuyá que presentaban síntomas relacionados con fusariosis y verrugosis en el cultivo de maracuyá en el municipio de Pacho, Cundinamarca.



**Figura 6** A. Sintomatología de fusariosis en cultivo de *P. edulis*. B. Cultivo de *P. edulis* afectado el 100% por fusariosis. C y D. Maracuyá afectado. Autoras, 2019

### 3.8.2 Toma de muestra

Las muestras de material enfermo, suelo rizosférico y filósfera se colectaron en bolsas ziploc, se rotularon con la ubicación y nombre de la finca y fueron transportadas al laboratorio de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca sede Bogotá, donde se realizó el análisis macroscópico y microbiológico.

Para la toma de estas muestras se seleccionaron varios puntos en la finca que mostraran mayor afectación y sintomatología particulares de Fusariosis y Verrugosis; en estos lugares se realizó un hoyo con una ayuda de una pala aproximadamente 20 a 30 cm de profundidad y se tomaron alrededor de 400 a 500 gramos por muestra en bolsas ziploc. Ver figura 7. En cuanto al material vegetal, también se tuvo en cuenta que presentaran signos de clorosis, manchas, verrugas y marchitez característica de estas patologías. En la tabla 7 se observa la descripción de las muestras tomadas en la finca para su posterior análisis.

<b>Finca</b>	<b>Muestra</b>	<b>Descripción</b>
Todas las muestras fueron tomadas en la finca Patio bonito, en el municipio de Pacho Cundinamarca.  El cultivo inicial de Maracuyá era de 100 plantas, las cuales cerca de 20 plantas presentan sintomatología similar.	No. 1	Suelo sano
	No. 2	Suelo afectado
	No. 3	Suelo afectado
	No. 4	Material vegetal afectado, presenta verrugas, marchitez y clorosis.



**Figura 7** A. Toma de muestra de suelo en la finca “Patio Bonito” en Pacho- Cundinamarca de un cultivo de maracuyá. B. Cultivo afectado de maracuyá por Fusariosis y C. Muestras recolectadas de suelo y material vegetal representativos para el estudio. Autoras, 2019.

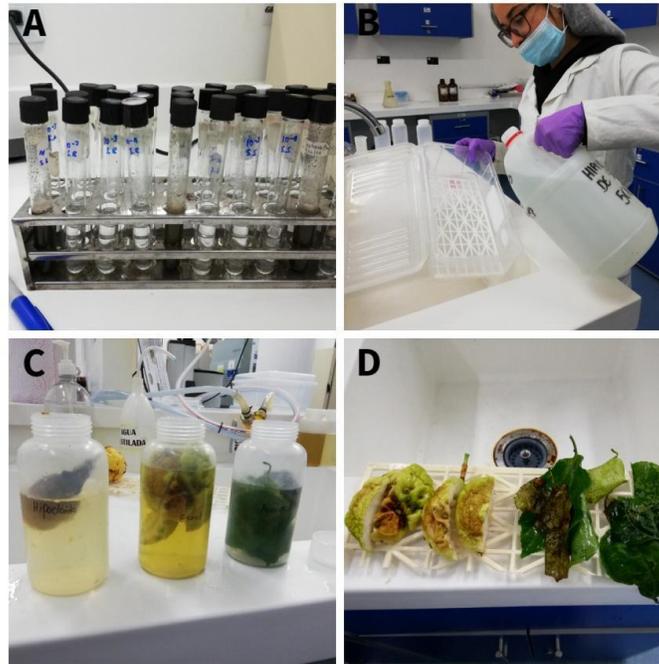
## **Segunda fase: Identificación fenotípica de microorganismos**

### **3.8.3 Aislamiento inicial:**

Para la primera siembra de las muestras de suelo, se realizaron diluciones seriadas (De  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ), posteriormente se hizo la siembra de las diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  en los agares Sabouraud, PDA, YCG y Rosa de bengala (100uL) para favorecer el crecimiento de los hongos y se utilizó agar BHI para el crecimiento de bacterias.

En cuanto a la siembra del material vegetal, se utilizaron dos técnicas: (I) En los medios de cultivo, Sabouraud, PDA, YCG y Rosa de bengala para la recuperación del hongo fitopatógeno y BHI para bacterias, en segmentos pequeños de la hoja y fruto aproximadamente de un 1 x 1 cm. (II) En cámara húmeda, por medio de un recipiente plástico limpio y estéril; de igual manera se disponen segmentos del

material vegetal de 5 a 10 cm y se sella con papel vinipel durante 8 días a temperatura ambiente.



**Figura 8** A. Preparación de las diluciones seriadas en las muestras de suelo. B. Lavado de la cámara húmeda con abundante agua y jabón, posteriormente hipoclorito al 0,5%, agua destilada estéril y etanol al 75%. C. Lavados del material vegetal en hipoclorito al 0,5%, agua destilada estéril y etanol al 75% para garantizar el crecimiento del agente patógeno y no un contaminante. D. Material vegetal limpio. Autoras, 2019.

Para la obtención de resultados en cuanto al conteo celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Número de colonias por placa} \times \text{factor de dilución}^*}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

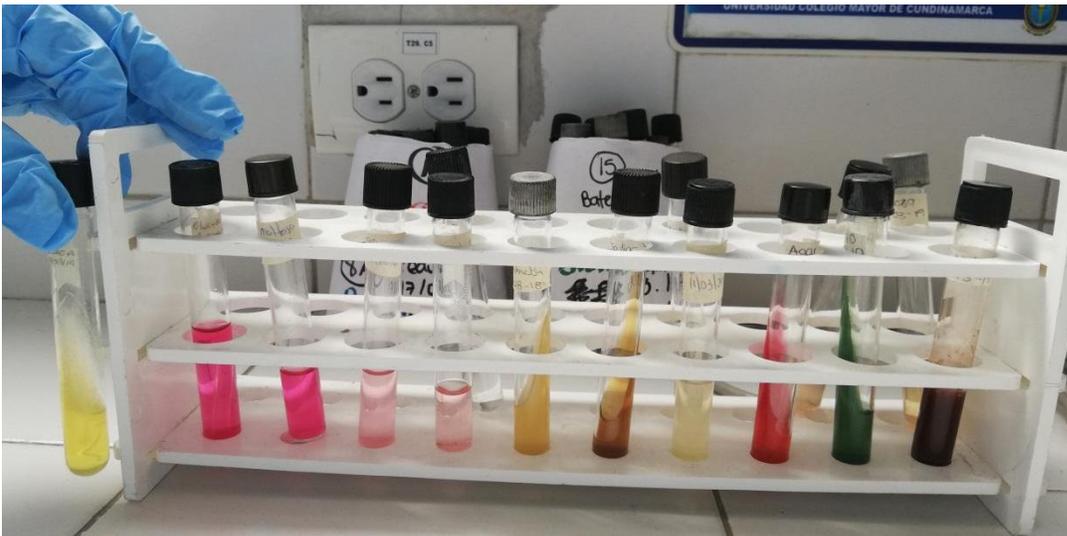
\*Factor de dilución: Inversa de cada una de las diluciones

### 3.8.4 Identificación microbiológica

A través de la tinción de Gram, se realizó la identificación microscópica de las colonias previamente obtenidas en el aislamiento inicial; para las estructuras fúngicas obtenidas se hizo la identificación a través de azul de lactofenol. En el

caso de las bacterias, se emplearon pruebas bioquímicas como método de identificación.

En esta fase se establecieron criterios de inclusión y exclusión con las colonias obtenidas del aislamiento primario para continuar con el estudio. En cuanto a bacterias, se descartaron cocos gram positivos y cocos gram negativos para el antagonismo y como posibles controladores biológicos; en cuanto a hongos, se seleccionaron aquellos que presentaban mayor compatibilidad con las patologías mencionadas en el estudio, un hongo que fue aislado por el método de cámara húmeda y otro del fruto sano.



**Figura 9.** Pruebas bioquímicas en tubo realizadas en el estudio como identificación bacteriológica. Autoras, 2019.

Los microorganismos previamente aislados, purificados y analizados de las muestras obtenidas de las plantas de maracuyá, que cumplieron con los criterios de inclusión mencionados, fueron transferidos a la fase final a través de técnicas de biología molecular (extracción de ADN, PCR y electroforesis).

### **Tercera Fase: Pruebas de antagonismo *in vitro***

Mediante la obtención de microorganismos aislados y purificados, se realizaron enfrentamientos por la técnica de enfrentamiento dual, con los patógenos reconocidos versus los microorganismos aislados e identificados previamente en la segunda fase, esto a nivel *in vitro*, como medio experimental en el laboratorio. Se utilizaron medios previamente seleccionados (PDA, Sabouraud y BHI).

#### **Cuarta fase: Identificación genotípica de microorganismos**

Una vez realizada la identificación fenotípica de los posibles patógenos, y los que demostraron antagonismo, se hizo la identificación molecular, realizando los procedimientos que se describen a continuación:



**a) Obtención de biomasa:** Por medio del caldo papa dextrosa, se inocularon los hongos aislados en medios de cultivo por 8 días a temperatura ambiente y en la oscuridad para favorecer su crecimiento.

**b) Extracción de ADN:** se realizó la extracción de ADN utilizando Quick DNA™ Universal Kit 04068. Una vez obtenida la muestra de 25 mg del hongo mediante un asa estéril en un tubo de microcentrífuga, se le adicionó: 95 uL de agua destilada, 95 uL de buffer azul, 10 uL de proteinasa K. Luego se llevó al vortex durante 30 minutos y se incubó a 55°C por 2 horas. Posteriormente, se centrifugó a >12000 g por un minuto y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Luego se agregó el doble de Genomic binding buffer al sobrenadante obtenido, esta mezcla se transfirió a una columna nueva en un tubo de colección proporcionado por el kit y se centrifugó a 12000 g por un minuto al terminar se descartó el tubo de colección. Se agregaron 400 uL de ADN – pre wash buffer en la columna en un nuevo tubo de colección y se centrifugó a 12000 g por un minuto.

Posteriormente, se agregaron 700 uL de ADN wash buffer y se centrifugó, para terminar el lavado del ADN se repitió el mismo procedimiento usando solamente 200 uL. Finalmente, para extraer el ADN, se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y se agregó 55 uL de DNA elution Buffer, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por un minuto.



**Figura 10** Quick DNA™ Universal Kit 04068 utilizado para extracción de ADN.  
Autoras, 2019.

- c) **Amplificación de ADN por PCR:** Para llevar a cabo esta amplificación por PCR se realizaron los cálculos necesarios para llevar a un volumen de reacción de 15 uL y luego de 60 uL, la cual se explica en la siguiente tabla:

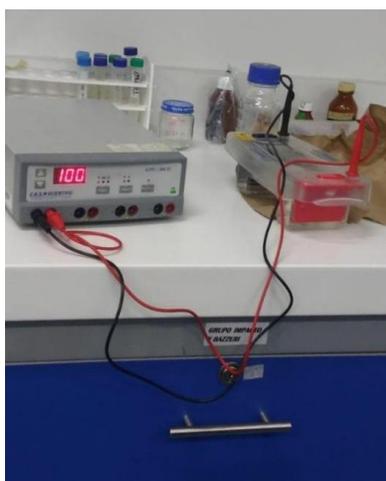
**TABLA 8. PREPARACIÓN DE LA PCR PARA LAS MUESTRAS SELECCIONADAS.**

	Volumen inicial	
One taq quick load	7,5 uL	30 uL
ITS 1	0,3 uL	1,2 uL
ITS 4	0,3 uL	1,2 uL
DNA	2 uL	6 uL
H <sub>2</sub> O estéril	4,9 uL	21,6 uL
<b>Total</b>	<b>15 uL</b>	<b>60 uL</b>

Las especificaciones de los ciclos en el termociclador utilizado se muestran a continuación:

TABLA. 9 PCR			
ETAPA	CICLOS	TIEMPO	TEMPERATURA
Inicio	1 ciclo	4 minutos	95 °C
Desnaturalización	35 ciclos	50 segundos	95 °C
Anillaje		1 minuto	55 °C
Extensión		1 minuto	72 °C
Elongación final	2 ciclos	5 minutos	72 °C
	1 ciclo	Indefinido	12 °C

Al terminar el proceso de PCR en el termociclador, se llevó a cabo la electroforesis donde se utilizó TAE (Base tris, acetato y EDTA) 1x y gel de agarosa para dar inicio a la corrida, éste se preparó utilizando 0,6 ml de TAE 1 x; Una vez lista la cámara, se colocaron las muestras en el gel, se cubrió en su totalidad con el buffer TAE 1x, se adecuaron los electrodos y se llevó a 100 voltios por 1 hora. Se usó un marcador de peso Bioron 100 pb DNA Ladder, al terminar, se visualizaron las bandas por medio de luz ultravioleta en el equipo “Molecular imager Gel Doc XR”



de marca BIO-RAD.

**Figura 11** Electroforesis realizada en la UCMC. Autoras, 2019.

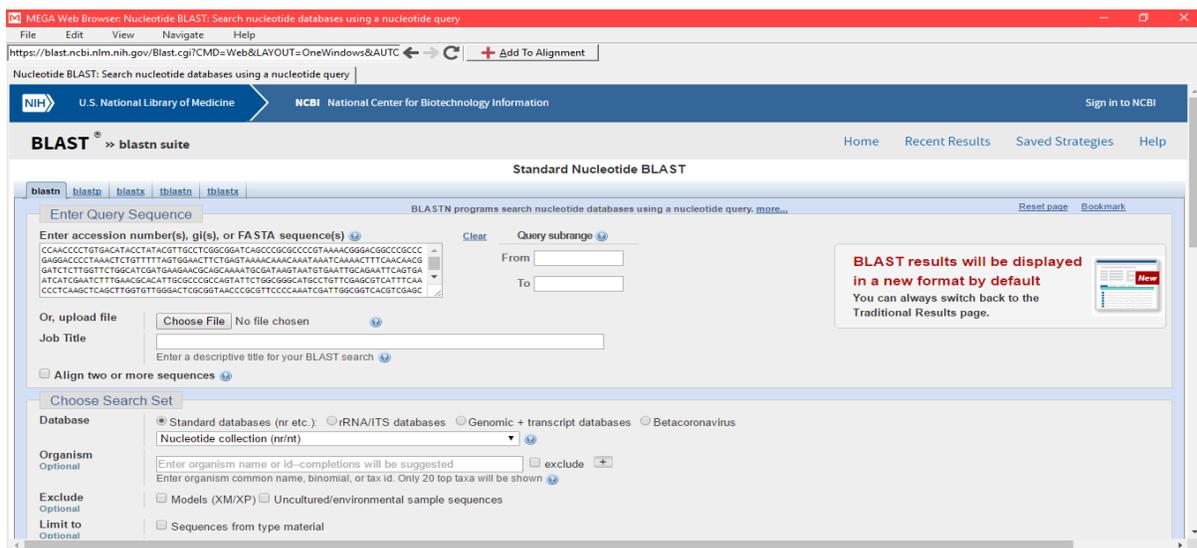
Posteriormente, los microorganismos de interés se enviaron a *Macrogen Inc* (Seúl, Corea) para realizar la secuenciación por metodología de Sanger y de esta manera reconocer al mismo genotípicamente.

Una vez llegaron las secuencias correspondientes, se hizo el arreglo a través del programa *MEGAX*. Por este medio se modificaron las secuencias ruido o de interferencia como se puede observar a continuación:



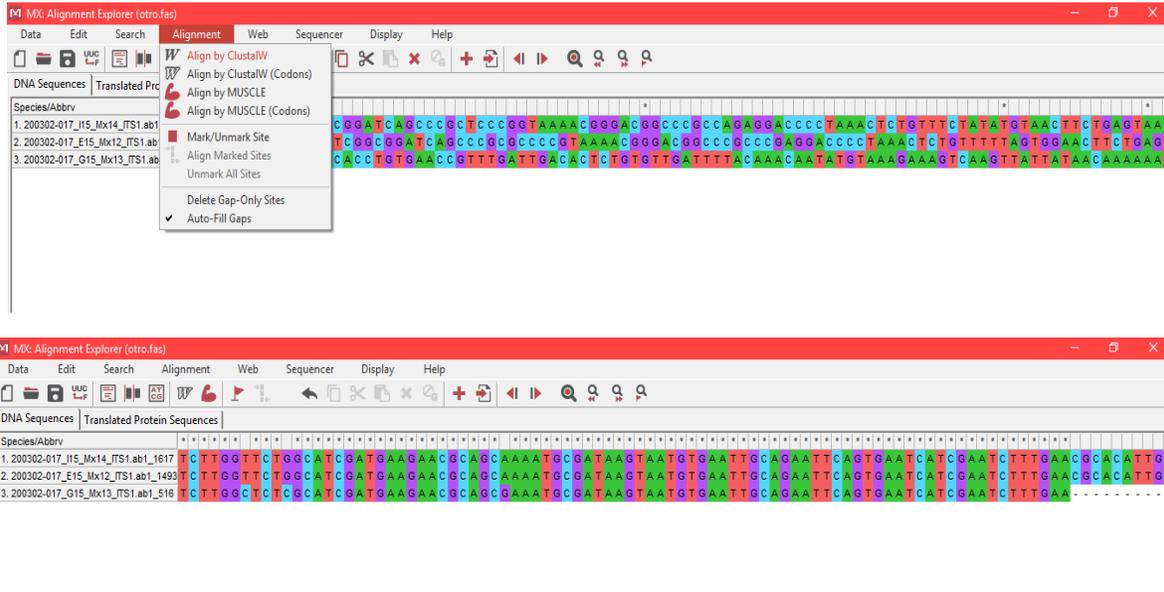
**Figura 12.** Trace editor de secuencias ruido. Autoras, 2020

Al obtener las secuencias modificadas en formato FASTA, y desde el programa *MEGAX*, se accedió a la base de datos de NCBI BLAST de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Fig 15) para poder obtener las alineaciones de las secuencias en comparación con las de la base de datos y de igual forma los microorganismos homólogos



**Figura 13.** Acceso a la base de datos BLAST, Autoras, 2020

Por último, para saber la relación entre los resultados obtenidos se realizó la alineación de nucleótidos por medio del algoritmo *ClustalW*, del programa MEGAX (Fig 16)



**Figura 14.** Alineación de nucleótidos por medio *ClustalW*, Autoras, 2020

## 4. Resultados

### 4.1. Identificación fenotípica de microorganismos

#### Aislamiento inicial:

A partir de las diluciones y los agares sembrados se obtuvo una gran variedad de microorganismos, en su mayoría, colonias compatibles con bacterias y hongos filamentosos; en las siguientes tablas, 10, 11 y 12, se observa la cantidad de unidades formadoras de colonias obtenidas UFC, en el caso de las bacterias, por agar en las 3 muestras de suelo. Para los hongos, el método de conteo se hizo en agares que tuvieran antibiótico (Rosa de bengala y YGC), ya que permitieron un mejor aislamiento y crecimiento de hongos con características miceliales.

**TABLA 10 . CRECIMIENTO DE COLONIAS EN LA MUESTRA 1 DE SUELO**

<b>AGAR</b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>
<b>PDA</b>	Incontables	Incontables	270.026 UFC/ml
<b>SABOURAUD</b>	Incontables	Incontables	140.00 UFC/ml
<b>V8</b>	Incontables	Incontables	320.000 UFC/ml
<b>ROSA DE BENGALA</b>	Incontables	<b>11</b> colonias compatibles con hongos miceliales	<b>3</b> colonias compatibles con hongos miceliales
<b>YGC</b>	Incontables	<b>14</b> colonias compatibles con hongos miceliales	<b>4</b> colonias compatibles con hongos miceliales
<b>BHI</b>	Incontables	Incontables	Incontables

**TABLA 11. CRECIMIENTO DE COLONIAS EN LA MUESTRA 2 DE SUELO**

<b>AGAR</b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>
<b>PDA</b>	Incontables	Incontables	810.000 UFC
<b>SABOURAUD</b>	Incontables	Incontables	Incontables
<b>V8</b>	Incontables	Incontables	Incontables
<b>ROSA DE BENGALA</b>	Incontables	<b>8</b> colonias compatibles con hongos miceliales	<b>2</b> colonias compatibles con hongos miceliales
<b>YGC</b>	Incontables	<b>16</b> colonias compatibles con hongos miceliales	<b>5</b> colonias compatibles con hongos miceliales
<b>BHI</b>	Incontables	Incontables	Incontables

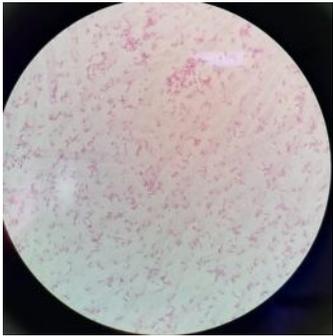
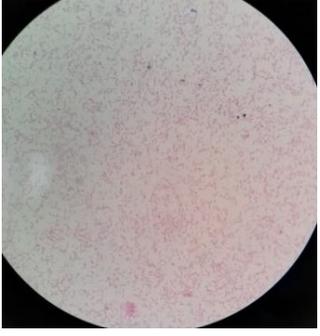
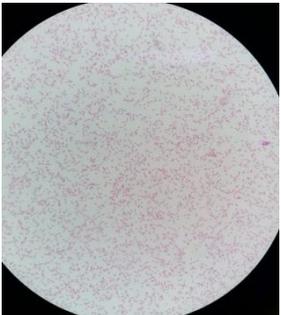
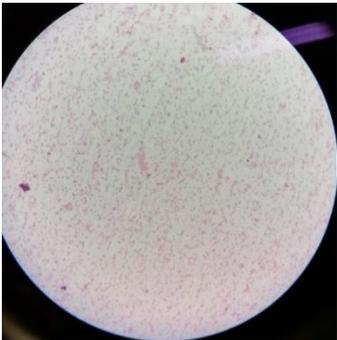
**TABLA 12 . CRECIMIENTO DE COLONIAS EN LA MUESTRA 3 DE SUELO**

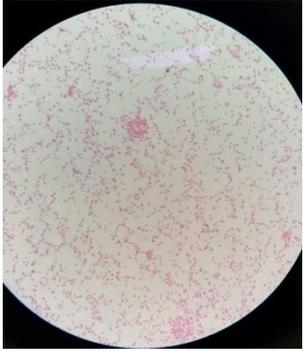
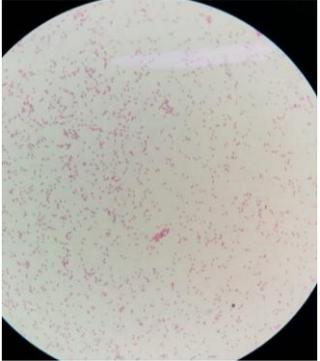
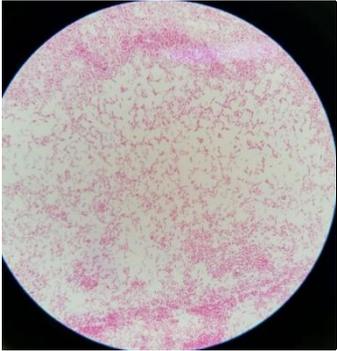
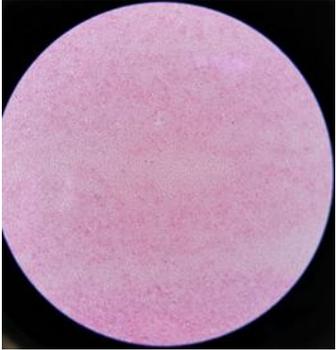
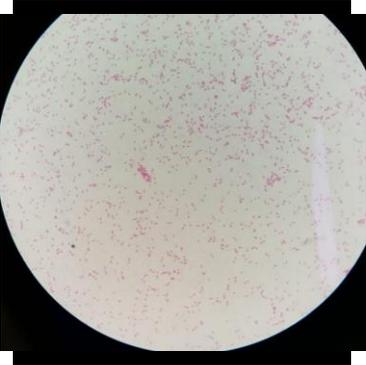
<b>AGAR</b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>
<b>PDA</b>	Incontables	Incontables	730.000 UFC/ml
<b>SABOURAUD</b>	Incontables	Incontables	470.000 UFC/ml
<b>V8</b>	Incontables	Incontables	2x10 <sup>6</sup> UFC/ml
<b>ROSA DE BENGALA</b>	Incontables	<b>6</b> colonias compatibles con hongos filamentosos	<b>4</b> colonias compatibles con hongos filamentosos
<b>YGC</b>	Incontables	<b>17</b> colonias compatibles con hongos filamentosos	<b>12</b> colonias compatibles con hongos filamentosos
<b>BHI</b>	Incontables	Incontables	Incontables

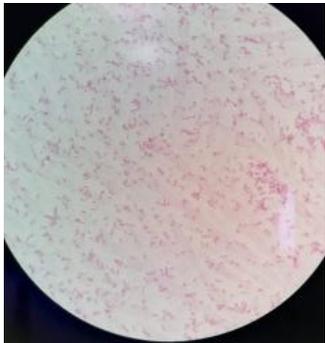
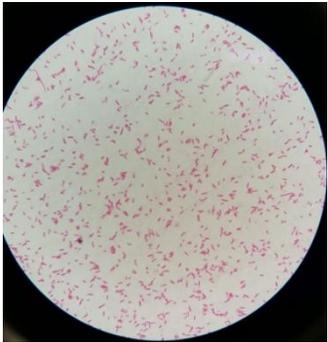
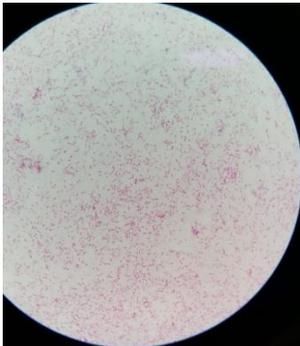
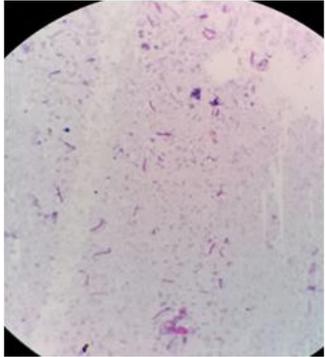
### **Identificación microscópica y macroscópica**

En la tabla 13, se observan los resultados obtenidos a partir de tinción Gram realizada a las bacterias seleccionadas de cada agar y, adicionalmente, las

obtenidas a partir del aislamiento en cámara húmeda y las sembradas de la muestra de fruto sano.

<b>TABLA 13. DESCRIPCIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA DE LAS COLONIAS OBTENIDAS EN EL AISLAMIENTO INICIAL EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS ESTUDIO</b>			
<b>MEDIO DE CULTIVO Y DILUCIÓN</b>	<b>DESCRIPCIÓN MACRO Y MICROSCOPICA</b>	<b>MEDIO DE CULTIVO Y DILUCIÓN</b>	<b>DESCRIPCIÓN MACRO Y MICROSCOPICA</b>
<b>Muestra 3.</b> <b>Agar BHI 10<sup>-4</sup></b>  <b>1A</b>	 <p><b>Fig. 15</b> Bacilos Gram negativos Colonias grandes blancas, lisas, con bordes cóncavos</p>	<b>Muestra 2</b> <b>Sabouraud 10<sup>-4</sup></b>  <b>3A</b>	 <p><b>Fig. 16</b> Bacilos Gram negativos Colonias medianas blancas cremosas</p>
<b>Muestra 3.</b> <b>Agar Sabouraud 10<sup>-3</sup></b>  <b>3B</b>	 <p><b>Fig. 17</b> Bacilos Gram negativos cortos. Colonias pequeñas, uniformes con pigmento amarillo</p>	<b>Muestra 2.</b> <b>Agar BHI</b>  <b>10<sup>-3</sup></b>  <b>4A</b>	 <p><b>Fig. 18</b> Cocos Gram positivos Colonias pequeñas, cremosas con pigmento rojo</p>

<p>Muestra 2. Agar Sabouraud <math>10^{-4}</math></p> <p>5A</p>	 <p><b>Fig. 19</b> Bacilos Gram negativos cortos</p> <p>Colonias grandes, cremosas con pigmento rosa claro</p>	<p>Muestra 2. Agar BHI <math>10^{-4}</math></p> <p>6B</p>	 <p><b>Fig. 20</b> Cocos Gram negativos</p> <p>Colonias pequeñas, cremosas con pigmento rojo</p>
<p>Muestra 2. Agar Sabouraud <math>10^{-4}</math></p> <p>7B</p>	 <p><b>Fig. 21</b> Bacilos Gram negativos alargados</p> <p>Colonias pequeñas uniformes con pigmento amarillo</p>	<p>Muestra 2. Agar V8 <math>10^{-4}</math></p> <p>8A</p>	 <p><b>Fig. 22</b> Bacilos Gram negativos</p> <p>Colonias grandes cremosas, borde definido con pigmento fluorescente</p>
<p>Muestra 2. Agar V8 <math>10^{-4}</math></p> <p>8B</p>	 <p><b>Fig.23</b> Bacilos Gram negativos</p> <p>Colonias grandes con bordes</p>	<p>Muestra 1. Agar Sabouraud <math>10^{-4}</math></p> <p>9A</p>	 <p><b>Fig. 24</b> Bacilos Gram negativos gruesos</p> <p>Colonias grandes blancas redondas con borde definido</p>

	definidos de color rojo		
<b>Muestra 1.</b> <b>Agar BHI</b> $10^{-4}$  <b>9B</b>	 <b>Fig. 25</b> Bacilos Gram negativos Colonias blancas cerebriformes de color blanco uniformes	<b>Muestra Fruto Sano Agar Sabouraud</b>  <b>10B</b>	 <b>Fig. 26</b> Bacilos Gram negativos grandes esporulados Colonias blancas grandes de color blanco uniformes
<b>Muestra Fruto Sano Agar BHI</b>  <b>11B</b>	 <b>Fig. 27</b> Bacilos Gram negativos alargados Colonias grandes cremosas de color amarillo oscuro	<b>Muestra Material vegetal Agar BHI</b>  <b>12</b>	 <b>Fig. 28</b> Bacilos Gram positivos alargados Colonias grandes bellas y cremosas transparentes

Después de la identificación por tinción de Gram, se seleccionaron bacilos Gram negativos y se descartaron cocos Gram positivos teniendo en cuenta los criterios de exclusión mencionados. En la tabla 14 se evidencian los resultados obtenidos mediante pruebas bioquímicas realizadas:

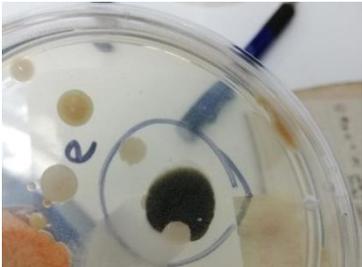
TABLA 14. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA POR PRUEBAS BIOQUIMICAS																				
	LIA	TSI	CITRATO	MIO	MOTILIDAD	FeA	SACAROSA	LACTOSA	GLUCOSA	MALTOSA	XILOSA	VP	RM	NITRATOS	UREA	GELATINA	TRIPTOFANO	MANITOL	ALMIDON	BILIS
1A	K/ K	K/ K	+	+	+	-	d	-	d			-		-	-		-			
3A	K/ K	K/ K	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d		-			
8A	K/ K	K/ K	d	+/-	+	-	-	-	-	-		-	d	-	d		-			
8B	K/ K	A/ A	+		+ Pig roj		+		+ CO 2	-	d			+	+	-		+		

Según los datos obtenidos y los parámetros planteados en el manual de procedimientos Bacteriología aplicada, las bacterias Gram negativas 3A y 8A dieron negativo para fermentación de azúcares, estas bacterias se caracterizan por su amplia distribución en la naturaleza principalmente ayudando en la mineralización de los suelos. Las bacterias 1A y 8B, dieron positivo para fermentación de glucosa principalmente, lactosa, sacarosa y xilosa; una de ellas con producción de CO<sub>2</sub> y pigmento de color rojo en el tubo motilidad. Estas bacterias Gram negativas fermentadoras de azúcares, se encuentran predominantes en la rizósfera del suelo, y algunas de ellas han sido reportadas como biocontroladoras de microorganismos fitopatógenos<sup>43</sup>.

Con respecto a los hongos, se obtuvo variedad de hongos miceliales compatibles especialmente con *Fusarium* spp. No se encontraron estructuras compatibles con *Cladosporium* spp. En la tabla 15, se presenta la observación macroscópica de los hongos

**TABLA 15. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS HONGOS OBTENIDOS A PARTIR DEL AISLAMIENTO INICIAL EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS ESTUDIO**

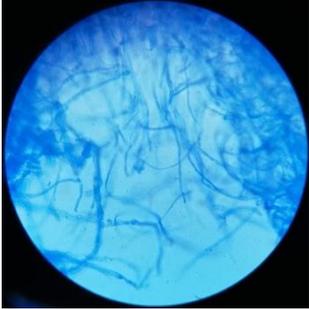
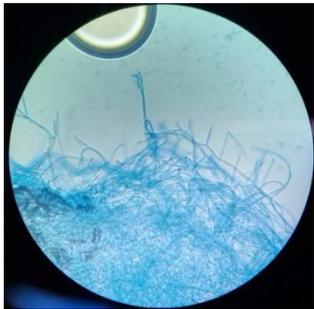
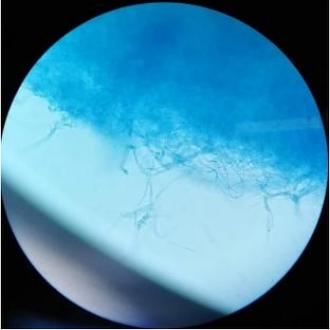
MEDIO DE CULTIVO Y DILUCIÓN	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	MEDIO DE CULTIVO Y DILUCIÓN	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS
<p><b>Muestra 2.</b> <b>Agar Rosa de Bengala</b> <b>10<sup>-4</sup></b></p>	<p>Colonia mediana de color blanco, compacta con divisiones en el centro y superficie algodonosa</p>  <p align="center"><b>Fig. 29</b> Hongo 1</p>	<p><b>Muestra 2.</b> <b>Agar Rosa de Bengala</b> <b>10<sup>-3</sup></b></p>	<p>Colonia mediana de color naranja en el centro y bordes blancos, superficie filamentososa</p>  <p align="center"><b>Fig. 30</b> Hongo 2</p>
<p><b>Muestra 2.</b> <b>Agar YGC 10<sup>-4</sup></b></p>	<p>-Colonia mediana verde con bordes blancos compacta, superficie granular.</p> <p>-Colonia grande de color beige fragmentada con centro blanco definido, superficie aterciopelada</p>  <p align="center"><b>Fig. 31</b> Hongos 3 y 4</p>	<p><b>Muestra 1.</b> <b>Agar YGC</b> <b>10<sup>-4</sup></b></p>	<p>Colonia grande blanca con centro beige fragmentada en 4 partes, superficie algodonosa</p>  <p align="center"><b>Fig.32</b> Hongo 5</p>
<p><b>Muestra 1.</b> <b>Agar PDA 10<sup>-4</sup></b></p>	<p>Colonia pequeña verde oscura con bordes claros, superficie granular</p>	<p><b>Muestra 1.</b> <b>Agar Rosa de Bengala</b> <b>10<sup>-3</sup></b></p>	<p>Colonia mediana blanca de bordes irregulares, superficie algodonosa</p>

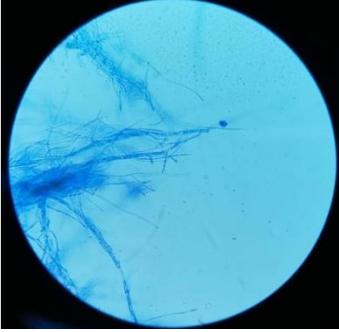
	 <p><b>Fig.33</b> Hongo 6</p>		 <p><b>Fig. 34</b> Hongo 7</p>
<p><b>Muestra 1.</b> <b>Agar Rosa de Bengala</b> <math>10^{-4}</math></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonia grande blanca, con superficie algodonosa y bordes irregulares</li> <li>- Colonia grande de color blanco con bordes irregulares, superficie filamentososa</li> <li>- Colonia pequeña amarillo, beige con bordes irregulares,</li> <li>- superficie algodonosa</li> </ul>  <p><b>Fig.35</b> Hongo 8, 9 y 10</p>	<p><b>Muestra 3.</b> <b>Agar Rosa de Bengala</b> <math>10^{-3}</math></p>	<p>Colonia grande de color blanco con bordes irregulares, superficie filamentososa. Colonia parecida al hongo número 9</p>  <p><b>Fig.36</b> Hongo 11</p>
<p><b>Muestra 3.</b> <b>Agar YGC</b> <math>10^{-4}</math></p>	<p>Colonias pequeñas con centro verde y borde blanco, superficie granular-algodonosa</p>  <p><b>Fig. 37</b> Hongo 12</p>	<p><b>Muestra 3.</b> <b>Agar Rosa de Bengala</b> <math>10^{-4}</math></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonia pequeña con centro de color verde y bordes blancos regulares, superficie granular</li> <li>- Colonia mediana con centro rosa y bordes blancos, fragmentada con superficie algodonosa</li> </ul>  <p><b>Fig.38</b> Hongo 13 y 14</p>

<p><b>Muestra Fruto Enfermo Agar Rosa de Bengala</b></p>	<p>Colonia grande de crecimiento rápido, con micelio de color blanco, superficie filamentososa</p>  <p><b>Fig.39</b> Hongo 15</p>	<p><b>Muestra Fruto Sano Agar YGC</b></p>	<p>Colonia mediana de crecimiento lento, color naranja con bordes irregulares, superficie aterciopelada</p>  <p><b>Fig.40</b> Hongo 17</p>
<p><b>Muestra Fruto enfermo Cámara húmeda Agar YGC</b></p>	<p>Colonia grande de crecimiento rápido, en su interior crece en forma de espiral, color café con micelio blanco, superficie filamentososa</p>  <p><b>Fig.41</b> Hongo 21</p>		

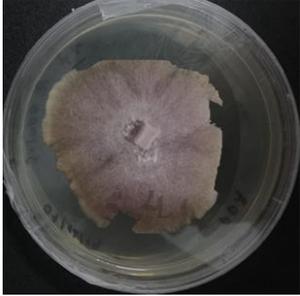
Después de haber descrito las respectivas colonias de los hongos se tuvo en cuenta las colonias que fueran más significativas y que tuvieran características morfológicas parecidas a *Fusarium* spp. No se encontraron estructuras compatibles con *Cladosporium* spp. Los resultados de la identificación microscópica con azul de lacto fenol se evidencian en la tabla 16.

**TABLA 16. IDENTIFICACIÓN MICROSCOPICA POR AZUL DE LACTOFENOL EN LOS HONGOS SELECCIONADOS**

NÚMERO DE HONGO	DESCRIPCIÓN	NÚMERO DE HONGO	DESCRIPCIÓN
<p>NÚMERO 7</p>	 <p><b>Fig.42</b> Hongo 7 azul de lacto fenol</p> <p>Hifas hialinas septadas, con presencia de clamidosporas y ausencia de microconidias compatible con <i>Fusarium spp.</i></p>	<p>NÚMERO 8</p>	 <p><b>Fig.43</b> Hongo 8 azul de lactofenol</p> <p>Hifas hialinas delgadas</p>
<p>NÚMERO 9</p>	 <p><b>Fig.44</b> Hongo 9 azul de lacto fenol</p> <p>Hifas hialinas septadas con presencia de clamidosporas y micronidias compatibles con <i>Fusarium spp.</i></p>	<p>NÚMERO 12</p>	 <p><b>Fig.45</b> Hongo 12 azul de lactofenol</p> <p>Hifas hialinas aseptadas con presencia de conidioforo</p>

<p><b>NÚMERO</b></p> <p><b>16</b></p>	 <p><b>Fig. 46</b> Hongo 16 azul de lacto fenol</p> <p>Hifas hialinas septadas con presencia de conidias redondas agrupadas</p>	<p><b>NÚMERO</b></p> <p><b>17</b></p>	 <p><b>Fig. 47</b> Hongo 17 azul de lacto fenol</p> <p>Hifas hialinas con presencia de atroconidias</p>
<p><b>NÚMERO</b></p> <p><b>21</b></p>	 <p><b>Fig. 48</b> Hongo 21 azul de lactofenol</p> <p>Hifas hialinas septadas gruesas y nucleadas, con ausencia de conidias</p>		

El hongo número 9 fue seleccionado como posible patógeno por sus características morfológicas compatibles con *Fusarium* spp, a continuación en la tabla 17 se mostrarán los resultados de las nuevas siembras realizadas en agar PDA, la descripción macroscópica y microscópica por azul de lacto fenol.

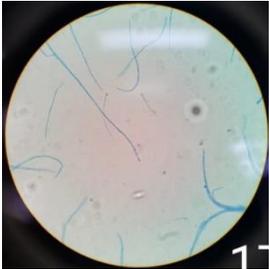
TABLA 17. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL POSIBLE PATÓGENO AISLADO COMPATIBLE CON <i>Fusarium sp.</i>			
<p><b>DESCRIPCIÓN COLONIA (FRENTE DE LA CAJA DE AGAR PDA)</b></p>	 <p><b>Fig. 49</b> Colonia posible patógeno por delante de la caja Colonia grande de crecimiento uniforme, con micelio algodonoso de color morado y bordes irregulares blancos</p>	<p><b>DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA</b></p>	 <p><b>Fig. 50 A</b> posible patógeno azul de lacto fenol</p>  <p><b>Fig. 52 B</b> posible patógeno azul de lacto fenol</p> <p>Hifas hialinas septadas con presencia de fialides, clamidosporas y microconidias unicelulares o con un septo de forma oval agrupadas o de manera individual</p>
<p><b>DESCRIPCIÓN COLONIA (DETRÁS DE LA CAJA DE AGAR PDA)</b></p>	 <p><b>Fig. 51</b> Colonia posible patógeno por detrás de la caja Colonia grande de crecimiento uniforme, por detrás presenta un color morado en el centro y hacia la periferia color curuba con bordes irregulares</p>		

**4.2. Pruebas de antagonismo *in vitro***

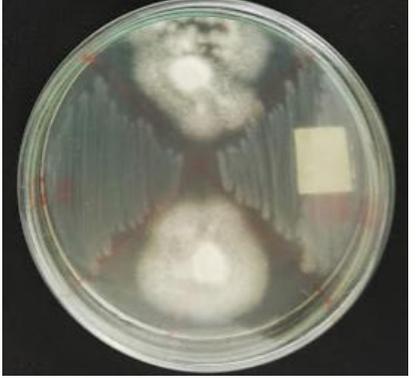
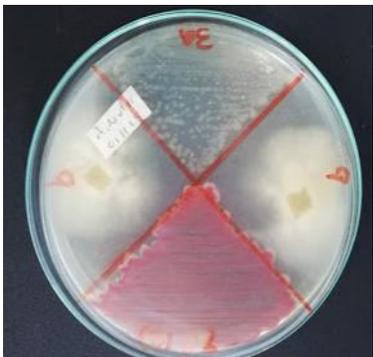
A continuación, se observan los resultados de los enfrentamientos realizados a nivel *in vitro*, donde se seleccionaron los hongos más representativos de cada muestra incluidos los de cámara húmeda y las bacterias identificadas por pruebas

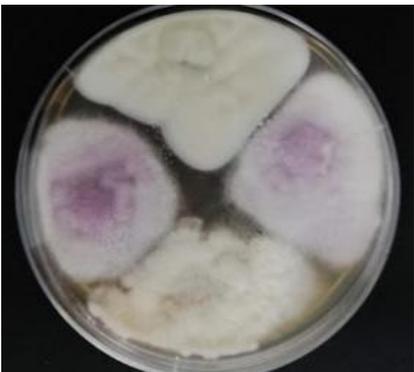
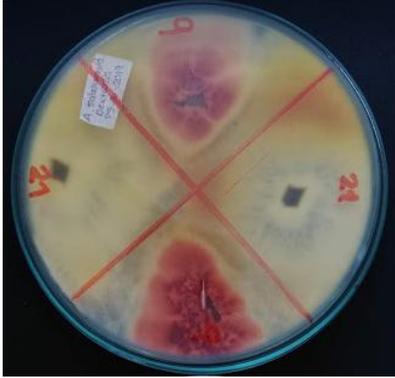
bioquímicas. Todos los enfrentamientos fueron realizados versus el patógeno seleccionado compatible con *Fusarium* spp.

En la tabla 18 se muestran los hongos seleccionados descritos microscópicamente por medio de la tinción azul de lacto fenol.

<b>TABLA 18. HONGOS SELECCIONADOS PARA ENFRENTAMIENTOS DESCRITOS MICROSCOPICAMENTE</b>			
<b>FOTO</b>			
	<b>Fig 53.</b> Hongo 8 tercera fase	<b>Fig 54.</b> Hongo 17 tercera fase	<b>Fig 55.</b> Hongo 21 tercera fase
	<b>DESCRIPCION</b>	Hifas hialinas delgadas	Hifas hialinas con presencia de arthroconidias

<b>TABLA 19. PRUEBAS DE ENFRENTAMIENTOS</b>	
N° de antagonismo	
1	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p><b>Fig.56</b> Enfrentamiento en agar PDA por el envés, patógeno H9 – Bacteria 8 A y 1 A</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>Fig.57</b> Enfrentamiento en agar nutritivo por el envés, patógeno H9 – Bacteria 8 A y 1 A</p> </div> </div>

	 <p><b>Fig.58</b> Enfrentamiento en agar PDA por el anverso, patógeno H9 – Bacteria 8 A y 1 A</p>	 <p><b>Fig.59</b> Enfrentamiento en agar nutritivo por el anverso, patógeno H9 – Bacteria 8 A y 1 A</p>
<p>2</p>	 <p><b>Fig.60</b> Enfrentamiento en agar PDA por el envés, patógeno H9 – Bacteria 3A y 8B</p>	 <p><b>Fig.61</b> Enfrentamiento en agar nutritivo por el envés, patógeno H9 – Bacteria 3A y 8B</p>
	 <p><b>Fig.62</b> Enfrentamiento en agar PDA por el anverso, patógeno H9 – Bacteria 3A y 8B</p>	 <p><b>Fig.63</b> Enfrentamiento en agar nutritivo por el anverso, patógeno H9 – Bacteria 3A y 8B</p>

	 <p><b>Fig.64</b> Enfrentamiento entre hongos en agar PDA por el envés, patógeno H9 – hongo H8 y H17</p>	 <p><b>Fig.65</b> Enfrentamiento entre hongos en agar Sabouraud por el envés, patógeno H9 – hongo H8 y H17</p>
3	 <p><b>Fig.66</b> Enfrentamiento entre hongos en agar PDA por el anverso, patógeno H9 – hongo H8 y H17</p>	 <p><b>Fig.67</b> Enfrentamiento entre hongos en agar Sabouraud por el anverso, patógeno H9 – hongo H8 y H17</p>
4	 <p><b>Fig.68</b> Enfrentamiento entre hongos en agar Sabouraud dextrosa por el envés, patógeno H9 – hongo H21</p>	 <p><b>Fig.69</b> Enfrentamiento entre hongos en agar Sabouraud dextrosa por el anverso, patógeno H9 – hongo H21</p>

En el enfrentamiento 1, se evidencia el crecimiento por parte de todos los microorganismos donde ninguno se ve afectado y tampoco presentan actividad antagónica alguna. En el enfrentamiento 2, la actividad antagónica aumenta para la bacteria 8 B (UFC roja) con el patógeno H9, donde también se diferencia el pigmento rojo en el agar nutritivo. En el agar PDA, no hay producción de pigmento pero se observa un halo de inhibición de crecimiento entre los microorganismos enfrentados. En el enfrentamiento 3, entre hongos, en los medios PDA y Sabouraud se observó que todos presentaron crecimiento. Sin embargo, el H8 y H17 presentaron actividad antagónica frente al patógeno. En el caso del H8, se observa una acción sobre el crecimiento del hongo H9 y para el hongo H17, se observa que desarrolló un mejor crecimiento en el agar sabouraud. Por último, en el enfrentamiento 4, entre los hongos H9 y H21, se evidenció mayor crecimiento del hongo H21, que el de H9, que permite inferir que el H21 tuvo algún efecto inhibidor sobre el hongo H9.

Los microorganismos que presentaron mejor comportamiento antagónico *in vitro* en los diferentes medios de cultivo utilizados fueron los hongos H8, H17, H21 y la bacteria 8B, los cuales podrían considerarse como posibles controladores biológicos, frente a los hongos con estructuras compatibles con *Fusarium* sp.

A continuación, se presenta el crecimiento en centímetros de los microorganismos usados en los enfrentamientos. Ver tabla 20.

TABLA 20. DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DEL PATÓGENO FRENTE AL POSIBLE BIOCONTROLADOR			
Enfrentamiento	Medio de cultivo	Crecimiento del patógeno	Posible biocontrolador
<b>Control positivo</b>	PDA	<i>F. oxysporum</i> : 2.4 cm	<i>Bacillus subtilis</i>
	Sabouraud	<i>F. oxysporum</i> : 2.5 cm	
	Nutritivo	<i>F. oxysporum</i> : 1.0 cm	
<b>1</b>	PDA Nutritivo	1A: 0.0 cm 1A: 0.0 cm	Ninguno

	PDA Nutritivo	8A: 0.1 cm 8A: 0.1 cm	
<b>2</b>	PDA Nutritivo	8B: 1.8 cm 8B: 1.3 cm	Bacteria 8B
	PDA Nutritivo	3A: 0.0 cm 3A: 0.0 cm	
<b>3</b>	PDA Sabouraud	H8: 0.8 cm H8: 0.9 cm	H8 H17
	PDA Sabouraud	H17: 0.8 cm H17: 0.2 cm	
<b>4</b>	Sabouraud	H21: 0.0	H21

### 4.3. Identificación molecular de microorganismos de interés para el estudio

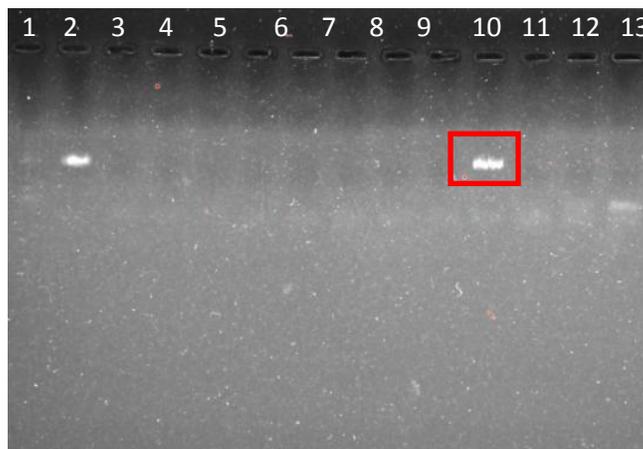
A continuación, se presentan los resultados de la electroforesis realizada al hongo H9, compatible con *Fusarium* sp., después de la realización de la extracción de ADN realizada mediante el kit Quick DNA™ Universal Kit 04068 y la amplificación e ADN por PCR, en la imagen 52 se puede evidenciar una banda de 500 y 1000pb como producto final de la PCR



**Fig. 70** Electroforesis del hongo H9 en “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD. Autoras, 2019

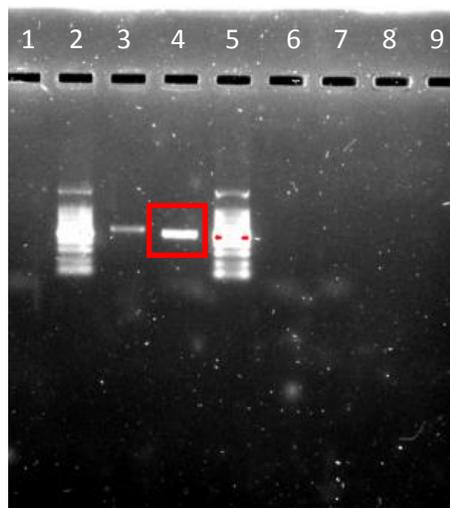
Los hongos que se clasificaron con el mejor antagonismo, H17, H21 y la bacteria 8B, fueron identificados genotípicamente. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la electroforesis de gel de agarosa después de la amplificación por PCR:

Hongo 17: en la figura 73, se evidencian dos bandas, en el pozo 2 la banda control positivo y en el pozo 10 una banda entre 400 y 1000pb como producto final de la PCR del hongo H17



**Fig 71.** Electroforesis del H17 obtenida en “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD. Autoras, 2020

Hongo 21: en la figura 74, se evidencian dos bandas, en el pozo 3 la banda del control positivo y en el pozo 4 una banda entre 500 y 1000pb como producto final de la PCR del hongo H21.



**Fig 72.** Electroforesis del H21 obtenida en “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD. Autoras, 2020

Bacteria 8B: en la figura 75, se evidencian dos bandas, en el pozo 3 entre 500 y 1000pb correspondiente a la bacteria 8B y en el pozo 4 el control positivo.



**Fig 73.** Electroforesis de la bacteria 8B obtenida en “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD. Autoras, 2020

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados al laboratorio *Macrogen Inc* para su posterior secuenciación, los resultados se pueden evidenciar en el Anexo 1.

En la tabla 21, se presentan los resultados obtenidos, después de realizar el arreglo de las secuencias y revisar en la base de datos NCBI BLAST de los microorganismos secuenciados.

**Tabla 21. RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA BASE DE DATOS  
BLAST**

<b>Nombre de la muestra presuntiva</b>	<b>Microorganismo compatible en BLAST</b>	<b>Long.</b>	<b>Máx. Puntaje</b>	<b>Puntaje Total</b>	<b>Cobertura</b>	<b>% de Identidad</b>	<b>Acceso BLAST</b>
Hongo 9 Macrogen: Mx 14	<i>Fusarium oxysporum</i>	650	923	923	73%	100%	5Y73BCN6016
Hongo 17 Macrogen: Mx 13	<i>Trichosporon porosum</i>	480	600	600	64%	100%	60DAHS7X014
Hongo 21 Macrogen: Mx 12	<i>Fusarium incarnatum</i>	650	956	956	83%	99.80%	60CCPDBM016
Bacteria 8B Macrogen: Mx 15	<i>Serratia marcescens</i>	1000	1671	1671	93%	97,86%	60J9GMYK016

El hongo patógeno, que tenía estructuras compatibles con *Fusarium* sp, en el análisis microbiológico, fue identificado genótipicamente como *Fusarium oxysporum*.

Los microorganismos antagónicos más eficientes fueron identificados genótipicamente como: H17 *Trichosporon porosum*, una levadura basidiomiceta anamórfica; H21 fue identificado como *Fusarium incarnatum*. La bacteria B8 dio como resultado *Serratia marcescens*, que ha sido considerada como un microorganismo con capacidad biocontroladora proveniente de suelo.

En la alineación de nucleótidos realizada en el programa *MEGAX* por medio del algoritmo *ClustalW* (figura 76), se evidenciaron las regiones variables en blanco y conservadas en amarillo entre *Fusarium oxysporum* y *Fusarium incarnatum*.



**Fig 74.** Alineación secuencias de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium incarnatum*, Autoras, 2020.

## 5. DISCUSIÓN

Los cultivos de maracuyá (*Passiflora edulis*), pueden presentar diferentes problemas a nivel fitosanitario que pueden llevar a pérdida de la producción y de la cosecha con hasta del 100%. En su mayoría, estos problemas se deben a enfermedades fúngicas las cuales atacan y perjudican los cultivos en diferentes momentos fenológicos y con una rápida propagación. Como lo expone Amata et al en 2011<sup>3</sup>, la fusariosis vascular, es una de las enfermedades con mayor prevalencia en los cultivos de pasifloras en especial en maracuyá; esta enfermedad se manifiesta como clorosis en las hojas, que luego pasa a un tizón foliar sistémico de color marrón claro. Estas lesiones se presentan en cualquier parte de las hojas del árbol; en estos casos, se presenta deformación foliar, marchitamiento y finalmente defoliación por infección del pedúnculo<sup>29</sup>. Otra de las enfermedades fúngicas presente en los cultivos de *P. edulis* es la roña o verrugosis, causada generalmente por el género *Cladosporium* spp, los síntomas inician como una decoloración de los tejidos, posteriormente se vuelven acuosos, luego con el secamiento de los tejidos aparecen lesiones en forma de verrugas<sup>7</sup>.

Las muestras recolectadas en la finca “Patio bonito” localizada en el municipio de Pacho, Cundinamarca, fueron muestras de un cultivo de *P. edulis* que según

manifestaron los dueños de la finca, con una pérdida aproximadamente del 20% de las plantaciones. Los síntomas expuestos por el agricultor fueron clorosis en hojas, deformación en frutos y árboles totalmente secos o con marchitez; frutos con lesiones en forma de verrugas, también estuvieron presentes. Pacho Cundinamarca, se caracteriza por tener una humedad que oscila entre el 70% a casi 95%, con temperaturas entre 12°C a 23°C, lo que indica que es un municipio de clima tropical seco, con alta nubosidad y bajas probabilidades de heladas<sup>39</sup>. El clima y la ubicación geográfica si bien son los que requiere el cultivo, también son un problema para la proliferación de las enfermedades fúngicas.

A partir de las muestras obtenidas de material enfermo, suelo rizosférico y filósfera, se obtuvo una variedad de microorganismos bacterianos y fúngicos gracias a los medios enriquecidos que le facilitan nutrientes como dextrosa, glucosa y peptona<sup>40</sup>. No se utilizó ningún antibiótico, ni antifúngico para obtener la mayor población posible a partir de las muestras ni el suelo. Se utilizó el método de cámara húmeda, para recuperar microorganismos fúngicos, que pudieran estar en un pequeño inóculo y no crecieran en los medios de cultivo en forma directa. Este medio es muy eficaz porque es sistema cerrado capaz de mantener una atmósfera saturada de humedad bajo condiciones estables de temperatura, como lo indicaron Monroy y Lizarazo en el año 2009, donde realizaron el aislamiento inicial de hongos fitopatógenos asociados al roble (*Quercus humboldtii* bonpl.), a través de cámara húmeda con papel filtro estéril, humedecido con agua destilada estéril, mantenida por siete a diez días con doce horas de luz y doce de oscuridad<sup>44</sup>. En el caso particular del presente trabajo, el hongo H21, *Fusarium incarnatum*, se obtuvo gracias a este método. Más adelante, se hablará de su actividad.

En una segunda fase de aislamiento y para evitar contaminación con microorganismos bacterianos, los hongos fueron aislados en Rosa de Bengala y YGC que tienen cloranfenicol. Esto garantizó la pureza de los aislamientos, para su posterior identificación genotípica.

Los hongos que han sido reportados como causantes de la fusariosis vascular, son los hongos del género *Fusarium* spp. El aislamiento H9, que fue luego identificado como *Fusarium oxysporium*, ha sido reportado por varios investigadores como el causante más común de “secadera”. Sus características macroscópicas y microscópicas son similares a las descritas por Leslie y Summerrel en 2006, micelios flocosos, escasos o abundantes y varían en color de blanco a violeta pálido; en la tinción azul de lactofenol se observaron hifas hialinas septadas con presencia de fiálides, clamidosporas y microconidias unicelulares o con un septo de forma oval agrupadas o de manera individual, compatible con *Fusarium* spp<sup>41</sup>. Este patógeno se caracteriza por su alta prevalencia en los cultivos de Pasifloras, como lo resalta Ortiz et al en 2014, citando dos especies, *Fusarium oxysporium* y *F. solani*. Las plantas infectadas por estos dos hongos, presentan leve clorosis foliar y un secado desigual en las hojas en las primeras etapas de la infección. Los síntomas se vuelven más severos, cuando las hojas se caen y el sistema vascular cambia de marrón a rojo, lo que finalmente lleva a la planta a la muerte. La podredumbre del collar se caracteriza por una necrosis generalizada de 2 a 10 cm de ancho, donde se pueden observar pequeños puntos rojos correspondientes al peritecio formado del patógeno<sup>10</sup>.

Respecto a la enfermedad denominada roña o verrugosis, de las muestras procesadas, no se obtuvo ningún aislamiento que por sus características microscópicas y macroscópicas fueran compatibles con el género *Cladosporium* spp., aunque el agricultor pensaba que si tenía también esta enfermedad en su cultivo de maracuyá. Entre las razones por las cuales no se pudieron obtener aislamientos de este hongo en este estudio, se puede inferir que la muestra que se recolectó tenía un inóculo muy pequeño de este hongo o que el tiempo de colonización del hongo en el fruto no era el suficiente. Esta enfermedad se caracteriza porque los síntomas se observan principalmente en hojas y en frutos, según Delgado y Zapata en el año 2012 registraron incidencia de la enfermedad y periodo de incubación del hongo en una edad óptima de susceptibilidad entre una y tres semanas en fruto<sup>4</sup>. Las muestras recolectadas para el presente estudio, tenían mayor prevalencia de síntomas característicos de fusariosis, aunque

algunos de los frutos y hojas, tenían síntomas de roña. Se evidencia entonces, que, no siempre la percepción del agricultor es la real, pues los protocolos de diagnóstico del cultivo y toma de muestras se hizo de acuerdo con lo estipulado para estos casos y el daño ocasionado en el fruto puede estar ligado a la fusariosis que es la enfermedad de base.

Para la identificación genotípica, única forma de identificar la especie de los hongos aislados, se tuvo especial cuidado en seguir los protocolos de la extracción de ADN, la PCR y utilización de los primers universales ITS (ITS1 e ITS 4), teniendo en cuenta que la ITS es una región del genoma de los hongos, que se encuentra repetidamente entre los genes del ARN ribosomal de la subunidad mayor (28S) y menor (18S) del ADN nuclear. Como lo resalta Sánchez L. en 2016, la región ITS generalmente se utiliza debido a que presenta un tamaño de entre 600 y 800 pb y esto influye en que puede ser fácilmente amplificado con dichos primers universales que son complementarios a las secuencias de los genes de ARNr, los genes repetidos del ADNr hacen a la región ITS fácil de amplificar a partir de muestras de ADN pequeñas, diluidas o muy degradadas, además de ser variable entre especies de hongos morfológicamente distintos<sup>42</sup>.

Los problemas fitosanitarios han existido y permanecido por años, afectando la calidad, productividad y el rendimiento en los cultivos. Según Amata et al 2011, Quiroga et al 2012 y Du Santos et al 2013, ha llevado a adoptar el uso de fungicidas y otras combinaciones de productos químicos, donde su uso ha sido controversial. Según Ortiz Nuñez et al, en 2017, el uso de estas sustancias trae consigo efectos e impactos ambientales indeseables, afectaciones a la salud humana y fenómenos de resistencia<sup>48</sup>. Por esta razón, se buscan constantemente alternativas para enfrentar ataques fúngicos. En esta investigación, se incluyó la búsqueda de microorganismos nativos con posible actividad biocontroladora, como alternativa al uso de agroquímicos, en particular para disminuir la resistencia que los hongos pueden tener a los fungicidas<sup>48</sup>.

Rojas Badía et al en 2017, dicen que los microorganismos indicados para cumplir esta labor son aquellos que aporten beneficios a las plantas y al ecosistema, los

que tengan la capacidad de ejercer un efecto positivo sobre el crecimiento y la salud de las plantas, que se logra a través de diversos mecanismos que incluyen la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno y el control biológico de patógenos<sup>49</sup>.

En este estudio, se aisló la bacteria 8B, identificada genotípicamente como *Serratia marcescens*. Es una bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae, reconocida ampliamente como poseedora de una alta actividad biológica como lo indica Zabaleta Mejía et al, la cual cuenta con una producción característica de un pigmento rojo, llamado prodigiosina derivado del grupo de los pirroles. En cuanto a los efectos antagonistas del *S. marcescens* sobre los hongos fitopatógenos, Zabaleta Mejía et al y López Zapata et al, indican que esta bacteria inhibe la esporulación, germinación de esporas y el crecimiento micelial, además induce también a alteraciones en la morfología de las colonia<sup>49</sup>. En otro estudio, se utilizó una cepa del *S. marcescens* como agente del control biológico para el control del marchitamiento por *Fusarium* en plátanos, donde se redujo la gravedad de la enfermedad mediante la estimulación de las defensas del huésped<sup>51</sup>. Como lo describe Ortiz et al, 2017 se observa mediante penetración, vacuolización, lisis y/o enrollamiento. En esta investigación, se evidenció la presencia de inhibición del crecimiento del H9, frente a B8, como se observa en las figuras 63 y 64. Se identifica un cambio en el micelio y un respeto por el espacio de la bacteria por parte del hongo.

Otra actividad antagónica de importancia, se presentó a través de H17, identificado genotípicamente como *Trichosporon porosum*, una levadura ubicua que generalmente se encuentran en sustratos ambientales y madera descompuesta<sup>54</sup>. En un estudio realizado por Kulakovskaya et al, resaltan la capacidad de producción de lípidos celulosos (específicamente lípidos de celobiosa) como un agente fungicida termoestable y resistente a las proteasas, pues estos lípidos exhiben actividades fungicidas contra diversas especies de levaduras y al mismo tiempo, suprimen el crecimiento de ascomicetos y

basidiomicetos<sup>55</sup>. Esto puede explicar la importancia de este microorganismo y un posible uso a futuro como biocontrolador.

El género *Fusarium* spp, presenta una clasificación amplia con respecto a su taxonomía, lo que genera que la identificación morfológica de la especie sea insuficiente por las diferentes variedades en ciertos caracteres. Por esta razón, es necesario el uso de técnicas moleculares en la identificación de especies de este patógeno. En esta investigación la identificación genotípica del *Fusarium* responsable de la afectación del cultivo de maracuyá, se utilizó una secuenciación tipo Sanger que al llevarse a la base de datos de NCBI, BLAST arrojó un 100% de homología con *Fusarium oxysporum*. De acuerdo con Martínez y Mendoza, la caracterización y diferenciación de formas especiales de *Fusarium oxysporum* mediante análisis de polimorfismos genéticos es más apropiado que solo considerar caracteres morfológicos o fisiológicos<sup>58</sup>. Como se mencionó, este hongo es uno de los patógenos con mayor prevalencia de la enfermedad fusariosis, en la familia de las Pasifloras a nivel nacional<sup>8,10</sup>. Este hongo no solo afecta esta variedad de plantas, sino que también muchos cultivos se ven afectados, se tiene informes en garbanzo, hortalizas y fresa<sup>59,60</sup>. La razón es, que por ser un habitante saprófito del suelo, al entrar en contacto con el huésped susceptible, puede colonizar todo el material vegetal de la planta, desde la parte vascular hasta zonas aéreas, induciendo a marchitez generalizada y estancamiento del desarrollo<sup>61</sup>

Existen estudios que reportan nuevas especies de *Fusarium* ligadas a cultivos de maracuyá; uno de ellos es el de Henao en el 2018, en su estudio de identificación molecular de especies del género *Fusarium*, donde halló 3 tipo de hongos asociados con el cultivo de maracuyá, 2 de ellos (*F. proliferatum* y *F. solani*) con reportes actualmente publicados, y *F. incarnatum* destacado como un nuevo patógeno que coloniza las plantas de maracuyá<sup>14</sup>. En la presente investigación, de acuerdo con los resultados obtenidos en la secuenciación con respecto al hongo H21, en la base de datos BLAST, registró una homología del 99.80% con el hongo *Fusarium incarnatum*, un hongo aislado por primera vez en nueces en

Argentina (2004) presentando como síntomas primarios manchas marrones necróticas de 20 mm de diámetro y 5 mm de profundidad<sup>45</sup>.

*F. incarnatum* se aísla en afectaciones de cultivos de arroz, sorgo, maíz y en frutas como el banano, característico en regiones subtropicales y templadas<sup>62</sup>. Aunque hay diversos informes que lo involucran en varias enfermedades, a menudo, no se considera como un patógeno importante en la planta<sup>46</sup>.

En el año 2017 Murad, Mohamed, Shohaimi y Zainudin estudiaron la diversidad genética y patogenicidad de las especies de *Fusarium* asociadas con la enfermedad de la podredumbre de la fruta en plantas de banano, donde *Fusarium incarnatum* fue una de las especies con mayor presencia en los aislamientos. Esta predominancia se obtuvo debido a su rápida tasa de crecimiento que podría suprimir el desarrollo de colonias de otras especies de *Fusarium* durante el proceso de aislamiento de hongos<sup>52</sup>. Este reporte, explicaría por qué en el enfrentamiento realizado contra *Fusarium oxysporum*, se evidencia la colonización de *Fusarium incarnatum* en todo el medio, deteniendo consigo el crecimiento del otro hongo presente.

Este hongo a menudo se asocia con el complejo de especies *Fusarium incarnatum equiseti*<sup>62</sup> pero rara vez como patógeno primario, puede presentarse como endófito o saprófito. Existen informes que lo reconocen como invasor secundario de diversas plantas o como patógenos de heridas débiles que causan la pudrición de almacenamiento de gran variedad de frutas. Leslie y Summerell<sup>46</sup> sugieren que *F. incarnatum* se presenta como un complejo de especies donde existe variación de la capacidad patogénica entre individuos del mismo género. Esta suposición podría ser válida también para las otras especies como *Fusarium oxysporum* debido a la alta colonización de la enfermedad desarrollada en la planta huésped la cual es determinada por tres factores, como, una cepa altamente virulenta, huésped de planta susceptible y condición ambiental favorable<sup>52</sup>.

La presencia de este hongo podría estar vinculada a la resistencia que se ha presentado en el cultivo por el uso excesivo de sustancias químicas, como lo

indica Carmona y Sutua, 2017, la resistencia constituye una propiedad heredable y estable de los organismos fúngicos, por la cual obtienen la habilidad de adaptación a diferentes condiciones agronómicas normalmente adversas, y por lo tanto pueden sobrevivir. Este proceso incluye sustitución genética de la población susceptible original del patógeno, mediante una nueva población genéticamente y bioquímicamente distinta, haciendo totalmente ineficiente el fungicida<sup>53</sup>.

Finalmente, en este estudio se evidenció un crecimiento fúngico óptimo y mayor a diferencia de la población bacteriana presente en las muestras de suelo analizadas, esto apunta hacia prácticas agresivas agrícolas y el uso de productos químicos, de los cuales hacen uso en la finca para atacar con frecuencia los patógenos presentes en los cultivos. Al respecto, Campiño Arias y Alzate Ramírez, 2014 indican que el uso de agroquímicos, fertilizantes y otras sustancias, lleva a cambios en torno a las características químicas y microbiológicas de los suelos y por ende la calidad de los mismos se ve afectada<sup>56</sup>. En otro estudio verificaron que el uso de algunos fungicidas pueden afectar negativamente la proliferación de microorganismos benéficos del suelo<sup>57</sup>, como las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) (Romero Perdomo et al, 2015).

En definitiva, El problema por el género *Fusarium* en Pasifloras, específicamente en maracuyá, requiere el cambio de actividades agronómicas y disminución del uso de agroquímicos, para disminuir las posibilidades de que los patógenos agresivos, encuentren estrategias para infectar las plantas y acabar con la producción de nuestros agricultores.

## **6. Conclusiones**

- Se aislaron diversas poblaciones fúngicas y bacterianas en las muestras de suelo rizosférico y filosfera en la Finca de Pacho Cundinamarca.

- Se realizó la identificación fenotípica de microorganismos fúngicos con características del género *Fusarium*, causantes de la enfermedad fusariosis o secadera en maracuyá y otras pasifloras. No se encontraron microorganismos fúngicos con características del género *Cladosporium*, según la literatura causantes de roña o verrugosis.
- Las pruebas de antagonismo permitieron evidenciar que el hongo levaduriforme *Trichosporon porosum* y la bacteria *Serratia marcescens*, ejercen antagonismo *in vitro* contra el *Fusarium oxysporum* encontrado.
- La identificación genotípica confirmó a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium incarnatum*, como los microorganismos causantes de la enfermedad en el cultivo de maracuyá; de la misma manera los antagonistas identificados genotípicamente fueron el hongo levaduriforme *Trichosporon porosum* y la bacteria *Serratia marcescens*.
- Se encontró un hongo del género *Fusarium*, *F. incarnatum*, el cual presentó competencia micoparasítica con *Fusarium oxysporum*. Esta especie ha sido reportada solamente en un estudio en Pasifloras. Su acción patógena o protectora no pudo definirse, pero de acuerdo con estudios de otros investigadores, puede estar involucrado en una patología secundaria en cultivos de maracuyá.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar un trabajo al lado del agricultor de la Finca Patio Bonito de Pacho, Cundinamarca, para que realice un Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades, disminuyendo el uso de agroquímicos.
2. Continuar el estudio con el hongo *Fusarium incarnatum*, por cuanto su presencia podría utilizarse como un indicador biológico de los procesos de infección por *Fusarium* en cultivos de maracuyá.

## Bibliografía:

1. Amata, R L. Incidence, prevalence and severity of passion fruit fungal diseases in major production regions of Kenya [Internet]. Journal of Applied Biosciences. 2009 [cited 27 May 2019]. Available from: <http://www.m.elewa.org/JABS/2009/20/4.pdf>
2. Angulo R. Maracuya [Internet]. Cropscience Bayer. 2010 [cited 26 May 2019]. Available from: <https://www.cropscience.bayer.co/~-/media/bayer%20cropscience/peruvian/country-colombia-internet/pdf/cartilla-maracuyá.ashx>
3. Amata R, Otipa M, Waiganjo M, Wasilwa L, Kinoti J, Kyamanywa S et al. Management strategies for fungal diseases in passion fruit production systems in Kenya [Internet]. AGRIS: International Information System for the Agricultural Science and Technology. 2011 [cited 27 May 2019]. Available from: [http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=0CB3FFEA03D6292A6F4E441D5651BE4E?request\\_locale=ru&recordID=US201400114111&query=&sourceQuery=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&centerString=&enableField=](http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=0CB3FFEA03D6292A6F4E441D5651BE4E?request_locale=ru&recordID=US201400114111&query=&sourceQuery=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&centerString=&enableField=)
4. Delgado C, Castaño J, Villegas B. edad óptima de susceptibilidad del maracuyá a la roña (*Cladosporium cladosporioides* ATK.) [Internet]. ResearchGate. 2012 [Consultado 15 Mayo 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/271202886\\_edad\\_optima\\_de\\_susceptibilidad\\_del\\_maracuya\\_a\\_la\\_rona\\_Cladosporium\\_cladosporioides\\_ATK](https://www.researchgate.net/publication/271202886_edad_optima_de_susceptibilidad_del_maracuya_a_la_rona_Cladosporium_cladosporioides_ATK)
5. Quiroga-Rojas L, Ruiz-Quiñones N, Muñoz-Motta G, Lozano-Tovar M. Microorganismos rizosféricos, potenciales antagonistas de *Fusarium* sp. causante de la pudrición radicular de maracuyá (*Passiflora edulis* sims)

[Internet]. Scielo.org.co. 2012 [consultado 27 May 2019]. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v61n3/v61n3a08.pdf>

6. Ocampo J, Urrea R, Wyckhuys K, Salazar M. Exploration of the genetic variability of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) as basis for a breeding program in Colombia [Internet]. *Acta agronómica*. 2012 [cited 19 May 2019]. Available from:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-28122013000400009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122013000400009)
7. Delgado-Méndez C, Castaño-Zapata J, Villegas-Estrada B. Caracterización del agente causante de la Roña del Maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) en Colombia [Internet]. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2013 [consultado 26 May 2019]. Disponible en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/5>
8. Du Santos A, de Oliveira E, Haddad F, Ferras F, Pereira M, Alves S. Identification of passion fruit genotypes resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* [Internet]. Scielo. 2013 [cited 27 May 2019]. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1982-56762013000300008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762013000300008)
9. Granobles O, Torres C. *Revista de ciencias universidad del Valle - Colombia* [Internet]. [revistaciencias.univalle.edu.co](http://revistaciencias.univalle.edu.co). 2013 [consultado 19 June 2019]. Disponible en:  
<http://revistaciencias.univalle.edu.co/?seccion=6.Publicaciones>
10. Ortiz E, Cruz M, Melgarejo L, Marquinez X, Hoyos L. Histopathological features of infections caused by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in purple passionfruit plants (*Passiflora edulis* Sims) [Internet]. Scielo. 2014 [cited 27 May 2019]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/sp/v40n2/v40n2a05.pdf>

11. Ferreira R, Rodrigues A, Moraes F, Silva E, Nascimento. Resíduos orgânicos no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Acta biol. Colomb.* 2015;20(3):111-120. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n3.44720>
  
12. Robledo J, Ángel C, Castaño J. Environmental Scanning Electron Microscopy of the Infection Process of *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae* in Seedlings of Passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) [Internet]. *Scielo.org.co*. 2017[cited 18 May 2019]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v41n159/0370-3908-racefn-41-159-00213.pdf>
  
13. Angel C, Robledo J, Castaño J. comparación de métodos de inoculación de *fusarium solani* f. sp. *passiflorae* en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) [Internet]. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2018 [consultado 20 Mayo 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262018000100023](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262018000100023)
  
14. Henao E, Hernández C, Salazar C, Velasco M, Gómez E. Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia [Internet]. *Scielo*. 2018 [citado 20 Mayo 2019]. Disponible en: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1659-13212018000100056](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212018000100056)
  
15. Gonzales X. La producción de pasifloras este año en Colombia llegaría a 241.393 toneladas según el gremio [Internet]. *Agronegocios*. 2018 [consultado 26 Mayo 2019]. Disponible en:

<https://www.agronegocios.co/agricultura/la-produccion-de-pasifloras-este-ano-en-colombia-llegaria-a-241393-toneladas-segun-el-gremio-2795199>

16. Bonilla M. Biogeografía y morfología de las Passifloraceae (Subg. Tacsonia, Rathea y Manicata) [Internet]. Biogeografía y morfología de las Passifloraceae (Subg. Tacsonia, Rathea y Manicata). 2014 [citado 24 Septiembre 2019]. Disponible en:  
[http://bdigital.unal.edu.co/47460/1/Bonilla\\_2014\\_Tesis\\_Maestr%C3%ADa.pdf](http://bdigital.unal.edu.co/47460/1/Bonilla_2014_Tesis_Maestr%C3%ADa.pdf)
17. Dallos M, Fisher G, Miranda D. Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales [Internet]. Bogotá: Gerard Fisher; 2019 [citado 30 Septiembre 2019]. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/257765541\\_Passifloraceae\\_Passifloras\\_Maracuya\\_Granadilla\\_Curuba\\_Gulupa](https://www.researchgate.net/publication/257765541_Passifloraceae_Passifloras_Maracuya_Granadilla_Curuba_Gulupa).
18. Clasificación para Kingdom Plantae Down to Genus Passiflora L. [Internet]. USDA. 2010 [cited 5 October 2019]. Available from:  
<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=PASSI&display=31>
19. Torres P. Estrategias de polinización en passifloras, especies: maracuyá amarillo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), Granadilla (*Passiflora ligularis Juss*) y gulupa (*Passiflora edulis Sims edulis*) [Internet]. Repositorio UDCA. 2018 [citado 30 Septiembre 2019]. Disponible en:  
<https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/1034/1/MONOGRAFIA%20PULA%20TORRES.pdf>
20. Pasifloras son buen ejemplo de aumento de exportaciones y sustitución de importaciones - 15 de marzo de 2017 [Internet]. Agronet. 2017 [citado 30 Septiembre 2019]. Disponible en:

<http://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/Pasifloras-son-buen-ejemplo-de-aumento-de-exportaciones-y-sustituci%C3%B3n-de-importaciones---.aspx>

21. Álvarez J, Cardenas J, Orozco J. Manual sobre el cultivo del maracuyá (*Passiflora edulis*) en Colombia [Internet]. 1st ed. Bogotá: Produmedios; 2019 [citado 1 Octubre 2019]. Disponible en: [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13329/43718\\_55460.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13329/43718_55460.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
22. Maracuyá para estimular el metabolismo, aliviar dolores y cuidar la vista [Internet]. Ecoagricultor. 2017 [citado 5 Octubre 2019]. Disponible en: <https://www.ecoagricultor.com/>
23. Thokchom R, Mandal G. Production Preference and Importance of Passion Fruit (*Passiflora Edulis*): A Review. 1st ed. Journal of Agricultural Engineering and Food Technology. Visva-Bharati: Journal of Agricultural Engineering and Food Technology; 2017. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/319313789\\_Production\\_Preference\\_and\\_importance\\_of\\_passion\\_fruit\\_Passiflora\\_Edulis\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/319313789_Production_Preference_and_importance_of_passion_fruit_Passiflora_Edulis_A_review)
24. Manual de cultivo de Maracuyá bajo buenas practicas agrícolas [Internet]. 1st ed. Medellin: Francisco Velz; 2014 [citado 5 October 2019]. Available from: [https://issuu.com/yosephcronwellojeda/docs/maracuya\\_bpa\\_0\\_2](https://issuu.com/yosephcronwellojeda/docs/maracuya_bpa_0_2)
25. Mora Castro D. El cultivo de Maracuyá *Passiflora edulis* en temporada invernal [Internet]. 1st ed. Bogotá, Colombia; 2011 [citado 20 Septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getattachment/a814b577-c0c0-4369-8ecd-4f01f971cf99/El-cultivo-de-maracuya-en-temporada-invernal.aspx>

26. Salinas Abadía H. Guía técnica para el cultivo de “maracuyá amarillo” [Internet]. 1st ed. Valle del Cauca; 2014 [citado 27 Septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.coursehero.com/file/46444449/Guia-Maracuya-INTEP-2014pdf/>
27. Castro Marcelo J, Paredes Rodríguez C, Muñoz Alva D. Cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis Sims* f. *flavicarpa* Deg.) [Internet]. 1st ed. Trujillo, Perú: Gerencia Regional Agraria La Libertad; 2009 [citado 5 Octubre 2019]. Disponible en: [http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20MARACUYA\\_0.pdf](http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20MARACUYA_0.pdf)
28. García Torres M. Guía Técnica cultivo de Maracuyá Amarillo [Internet]. 1st ed. La libertad, El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal; 2002 [citado 28 Agosto 2019]. Disponible en: <http://centa.gob.sv/docs/guias/frutales/Guia%20Maracuya.pdf>
29. Hernández Mahecha L, Castillo F, Ocampo J, Wyckhuys K. Guía de identificación de plagas y enfermedades para el maracuyá, la granadilla y la gulupa [Internet]. 1st ed. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 2011 [citado 5 Septiembre 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/260508294\\_Guia\\_de\\_identificacion\\_de\\_plagas\\_y\\_enfermedades\\_para\\_el\\_maracuya\\_la\\_granadilla\\_y\\_la\\_gulupa](https://www.researchgate.net/publication/260508294_Guia_de_identificacion_de_plagas_y_enfermedades_para_el_maracuya_la_granadilla_y_la_gulupa)
30. Ocampo J, Arias J, Bonilla M, Moreno C, Molina S. Cartillas frutales maracuyá / lulo [Internet]. 1st ed. Palmira, Valle del Cauca: Universidad Nacional de Colombia; 2013 [citado 5 Septiembre 2019]. Disponible en: [http://fedepasifloras.org/es/wp-content/uploads/2018/01/Cartilla\\_Maracuya-lulo\\_UNAL\\_2013.pdf](http://fedepasifloras.org/es/wp-content/uploads/2018/01/Cartilla_Maracuya-lulo_UNAL_2013.pdf)

31. Forero R et al. Análisis de la resistencia a *Fusarium oxysporum* en plantas de *Passiflora maliformis* L. 2nd ed. Revista colombiana de ciencias hortícolas. Bogotá, Colombia: Scielo; 2015.
32. Lozano T M et al. Manual del manejo preventivo de la secadera (*Fusarium* sp) en el cultivo del maracuyá [Internet]. 1st ed. Bogotá, Colombia; 2008 [citado 27 Septiembre 2019]. Disponible en:  
<https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/12860>
33. Delgado C, Castaño J, Villegas B. Caracterización del agente causante de la Roña del Maracuyá (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* Degener) en Colombia. 1ª ed. Revista academica colombiana de ciencias. Bogotá 2013. p. 216 Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v37n143/v37n143a05.pdf>
34. Ogarak R, Lejman A, Pushz W, Miodynzka P. Características y taxonomía de los hongos *Cladosporium*. 19a ed. Mikologia Lekarska. Polonia; 2012. p. 81) Available from:  
[https://www.researchgate.net/publication/233818972\\_Characteristics\\_and\\_taxonomy\\_of\\_Cladosporium\\_fungi](https://www.researchgate.net/publication/233818972_Characteristics_and_taxonomy_of_Cladosporium_fungi)
35. Cisneros F. Control de plagas agrícolas: 2. Control Biológico [Internet]. Agri food gateway. [citado 15 de Febrero 2020]. Disponible en:  
<https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/control-biologico-de-plagas.pdf>
36. Morales Boldini J, Prada Millán Y, Padilla Osorio JC, Montenegro Gómez SP, Fonseca Lara MR, Mosquera Mena RA,. Capítulo 11. Control Biológico. libro [Internet]. 30 de mayo de 2019 [citado 15 de febrero de 2020];00:201 -

21. Disponible en:  
[https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/book/article/view/3126\\_](https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/book/article/view/3126_)
37. Rubio V, Fereres A. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. 1st ed. Madrid: Dpto. Protección Vegetal. Serrano;. libro [Internet] [citado 15 de febrero de 2020] Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Fereres,%202005.pdf?>
38. Cadena J. Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* spp. [Internet]. 10th ed. México: Said Infante Gil; 2017 [citado 15 de Febrero de 2020]. Disponible en: <http://dspace.uan.mx:8080/bitstream/123456789/2147/1/requerimientos%20nutrimentales%20de%20la%20flor%20ave%20de%20paraiso%20%28strelitzia%20reginae%20aiton%29.pdf#page=11>
39. Clima promedio en Pacho, Colombia, durante todo el año [Internet]. Weather Spark. 2020 [citado 15 de Febrero de 2020]. Disponible en: <https://es.weatherspark.com/y/23390/Clima-promedio-en-Pacho-Colombia-durante-todo-el-a%C3%B1o>
40. Sabouraud agar [Internet]. Britanialab. [citado 15 de Febrero de 2020]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2971216486e.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2971216486e.pdf)
41. Leslie J, Summerell B. The Fusarium Laboratory Manual, Chapter 13 [Internet]. 1st ed. Iowa: Blackwell Publishing Professional; 2006 [cited 15 February 2020] p. 212-213. Available from: <http://doi: 10.1002 / 9780470278376>

42. Sánchez L. Identificación y caracterización de hongos de interés para su uso industrial y, en especial, en la industria alimentaria mediante el uso de métodos moleculares [Internet]. Universidad Pública de Navarra. 2016 [cited 15 February 2020]. Available from: [https://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/22336/TFG\\_Sanchez\\_Leyre.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/22336/TFG_Sanchez_Leyre.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
43. Orjuela O, Velez A, Gallego C. Bacteriología aplicada, Manual de procedimientos. 1st ed. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2014.
44. Monroy LY y Lizarazo LM; Identificación de hongos fitopatogenos asociados al roble (*Quercus humboldtii* bonpl.), en los municipios de encino (Santander), Arcabuco y Tipacoque (Boyacá). Revista Colombia Forestal. 2010 [citado 24 Feb 2020] Vol. 13 (2): 347-356. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v13n2/v13n2a11.pdf>
45. Seta S, Gonzalez M, Lori G. First report of walnut canker caused by *Fusarium incarnatum* in Argentina [Internet]. Plant Pathology. 2004 [cited 18 February 2020]. Available from: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.0032-0862.2004.00968.x>
46. Leslie J, Summerell B. The *Fusarium* Laboratory Manual, Chapter 13 [Internet]. 1st ed. Iowa: Blackwell Publishing Professional; 2006 [cited 15 February 2020] p.248-249. Available from: <http://doi:10.1002/9780470278376>
47. Ortiz Y, Ramos B, Nuñez R, Plana L. Actividad antagonista de cepas de *Cladobotryum*, *Beltraniopsis*, *Beltraniella* y *Beltrania* sobre *Fusarium*

*chlamydosporum*. [Internet]. Agrotecnia de Cuba. 2017 [cited 15 February 2020]. Available from: [https://www.researchgate.net/profile/Beatriz\\_Ramos14/publication/333430315\\_actividad\\_antagonista\\_de\\_cepas\\_de\\_cladobotryum\\_beltraniopsis\\_beltraniella\\_y\\_beltrania\\_sobre\\_fusarium\\_chlamydosporum/links/5ced5574458515026a6373ee/actividad-antagonista-de-cepas-de-cladobotryum-beltraniopsis-beltraniella-y-beltrania-sobre-fusarium-chlamydosporum.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Beatriz_Ramos14/publication/333430315_actividad_antagonista_de_cepas_de_cladobotryum_beltraniopsis_beltraniella_y_beltrania_sobre_fusarium_chlamydosporum/links/5ced5574458515026a6373ee/actividad-antagonista-de-cepas-de-cladobotryum-beltraniopsis-beltraniella-y-beltrania-sobre-fusarium-chlamydosporum.pdf)

48. Rojas Badía M, Sánchez Castro D, Rosales Perdomo K, Lugo Moya D. Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas [Internet]. *Revista Protección Vegetal*. 2017 [citado 5 Febrero 2020]; Vol.32 No.2. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522017000200005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000200005)
49. Zabaleta Mejía, Rojas M. Antagonismo de *Serratia marcescens* Bizio (enterobacteriaceae) sobre *Fusarium oxysporum* schlect. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyd and Hans. [Internet]. *Revista mexicana de fitopatología* 1989 [citado 15 Febrero 2020]; 7: pág 113-118. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/295105610\\_Antagonismo\\_de\\_Serratia\\_marcescens\\_Bizio\\_enterobacteriaceae\\_sobre\\_Fusarium\\_oxysporum\\_schlect\\_f\\_sp\\_lycopersici\\_Sacc\\_Snyd\\_and\\_Hans](https://www.researchgate.net/publication/295105610_Antagonismo_de_Serratia_marcescens_Bizio_enterobacteriaceae_sobre_Fusarium_oxysporum_schlect_f_sp_lycopersici_Sacc_Snyd_and_Hans)
50. López Zapata S, Castaño Zapata J. Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. *cubense* (E.F. SM.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: Una revisión [Internet]. *Revista U.D.C.A Actualidad y divulgación científica*. 2019 [citado 17 Febrero 2020]. Volumen 22 No. 2:e1240; Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v22n2/0123-4226-rudca-22-02-e1240.pdf>

51. Ting, A.S.Y. Meon, S. Kadir, J. Radu, S. Singh, G. 2010. Induction of host defense enzymes by the endophytic bacterium *Serratia marcescens*, in banana plantlets. *International Journal of Pest Management*[Internet] 2010. [citado 14 Feb 2020] Vol 56(2):183-188. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09670870903324198>
52. Abd Murad N, Mohamed Nor N, Shohaimi S, Mohd Zainudin N. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fruit rot disease in banana across Peninsular Malaysia [Internet]. *Journal of Applied Microbiology*. 2017 [cited 17 February 2020]. Available from: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jam.13582>
53. Carmona M. y Sautua F. La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas, causas y efectos extensivos. *Revista de la fac. de agronomía UBA. Agronomía y ambiente* [Internet] 2017; [citado 14 Feb 2020]. Vol 37 (1) 1-19. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/322087525\\_la\\_problemativa\\_de\\_la\\_resistencia\\_de\\_hongos\\_a\\_fungicidas\\_causas\\_y\\_efectos\\_en\\_cultivos\\_extensivos](https://www.researchgate.net/publication/322087525_la_problemativa_de_la_resistencia_de_hongos_a_fungicidas_causas_y_efectos_en_cultivos_extensivos)
54. Tapia C. Género *Trichosporon*. *REvista chilena de infectología*. [Internet]. 2009. [citado 14 Feb 2020]; Vol 26 N°3. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182009000400010](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000400010)
55. Kulakovskaya, T. V., Golubev, W. I., Tomashevskaya, M. A., Kulakovskaya, E. V., Shashkov, A. S., Grachev, A. A., Nifantiev, N. E. Production of Antifungal Cellobiose Lipids by *Trichosporon porosum*. *Mycopathologia* [Internet]. 2009 [cited 15 Feb 2020] 169(2), 117–123. Available from: doi:10.1007/s11046-009-9236-2
56. Campiño D y Alzate JD. Actividad microbiana de suelos con manejo orgánico y convencional. *RREDSI Red regional de semilleros de*

investigación. [Internet]. 2014 [citado 14 Feb 2020] Vol 1, pág 1930 – 1940. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Claudia\\_Herrera-Herrera/publication/284534849\\_el\\_proyecto\\_de\\_aula\\_como\\_herramienta\\_en\\_la\\_formacion\\_de\\_competencias\\_investigativas\\_en\\_estudiantes\\_de\\_ingenieria/links/56b0d15108ae8e372151f70b/el-proyecto-de-aula-como-herramienta-en-la-formacion-de-competencias-investigativas-en-estudiantes-de-ingenieria.pdf#page=1930](https://www.researchgate.net/profile/Claudia_Herrera-Herrera/publication/284534849_el_proyecto_de_aula_como_herramienta_en_la_formacion_de_competencias_investigativas_en_estudiantes_de_ingenieria/links/56b0d15108ae8e372151f70b/el-proyecto-de-aula-como-herramienta-en-la-formacion-de-competencias-investigativas-en-estudiantes-de-ingenieria.pdf#page=1930)

57. Romero FA, Camelo M. Bonilla R. Respuesta de *Bradyrhizobium japonicum* a la adición de alginato en presencia de fungicidas peletizados en semillas de soya. [Internet] Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 2015 [citado 24 Feb 2020]; 18 (2): 359 - 364. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/161/125>

58. Martínez LA; Medina C; Marbán N; Valadez E. Técnicas moleculares clásicas para la diferenciación de formas especiales de *Fusarium oxysporum*. Revista mexicana de micología. [Internet]. 2015 [citado 14 Feb 2020] Vol 42: 1-7. Disponible en: <http://scielo.org.mx/pdf/rmm/v42/v42a2.pdf>

59. Velarde F., Sixto et al. Molecular and biological identification of physiological races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato of chickpea in northwest Mexico. Rev. Mex. Cienc. Agrí [Internet]. 2015 [cited 14 Feb 2020], vol.6, n.4, pp.735-748. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2007-09342015000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-09342015000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=en)

60. Gonzalez P. Enfermedades del tomate. Uruguay. Facultad de agronomía / Unidad de fitopatología. 17 de abril 2006. [citado 3 marzo 2020]. Disponible en: [http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium\\_tom.html](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html)







