



**DETERMINACIÓN DEL PATÓGENO CAUSANTE DE “LA SECADERA” EN
CULTIVOS DE PASIFLORAS Y SU POSIBLE CONTROL BIOLÓGICO EN
FINCAS, MUNICIPIO DE PASCA, CUNDINAMARCA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. Junio de 2019**



**DETERMINACIÓN DEL PATÓGENO CAUSANTE DE “LA SECADERA” EN
CULTIVOS DE PASIFLORAS Y SU POSIBLE CONTROL BIOLÓGICO EN
FINCAS, MUNICIPIO DE PASCA, CUNDINAMARCA**

**KAREN SABINE MEDINA GARZON
LIZETH GERALDINE GALINDO GUERRERO**

**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. Junio de 2019**

DEDICATORIA

A nuestras familias, por todo el apoyo emocional y económico brindado, por no dejarnos caer y siempre apoyarnos en cada etapa de esta carrera y formando las personas que hoy en día somos

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por prestarnos sus instalaciones, medios de cultivo y reactivos necesarios para el desarrollo de la investigación.

A la Federación Colombiana de Pasifloras, por creer en nosotras y darnos la oportunidad de realizar el proyecto en fincas asociadas a la institución y brindarnos toda la ayuda necesaria en este proceso.

A los Agricultores de las cuatro fincas muestreadas, por dejarnos entrar en su vivienda y extraer un poco de su cultivo para el estudio, sin negarnos la oportunidad de realizar esta investigación.

Al Ingeniero Álvaro Solano, por regalarnos un día de su vida, un Tour por el municipio de Pasca, Cundinamarca y la ayuda en la recolección de cada muestra y el aprendizaje adquirido de vivencia en campo.

A nuestra compañera Camila Daza León, por su constante apoyo emocional, llenándonos de buena energía en los momentos más densos en el desarrollo de la investigación y en la parte de biología molecular.

A nuestra asesora de trabajo de grado, Ligia Consuelo Sánchez Leal, por inspirarnos y abrir las puertas a la investigación. Además, de darnos los primeros pasos, las bases y enseñanzas en este mundo de la ciencia.

Por último y no menos importante a la Doctora Martha Lucia Posada Buitrago, por toda la paciencia, cariño y sabiduría que nos brindó durante todo el proceso. Además, de estar pendiente a cualquier hora y en cualquier lugar de los problemas que se pudieran generar el laboratorio. Siempre estaremos inmensamente agradecidas por todo el esfuerzo que puso para nuestro trabajo de grado.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GENERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. ANTECEDENTES	20
4.0 MARCO REFERENCIAL	24
4.1 Generalidades de las Pasifloras	24
4.1.1 Clasificación Taxonómica de las <i>Passifloras</i>	24
4.1.2 Requerimientos para el Desarrollo de las <i>Passifloras</i>	24
4.2 Producción De Las Pasifloras En Colombia	25
4.3. Granadilla	26
4.4 Curuba	26
4.5 Badea	27
4.6 Maracuyá	28
4.6.1 Principales Características	28
4.6.1.1 Ciclo Fenológico	28
4.6.2 Requerimientos Generales Para El Crecimiento De Maracuyá.	29
4.6.2.1 Temperatura	29
4.6.2.1 Radiación solar	29
4.6.2.3 Altitud	29
4.6.2.4 Humedad Relativa	30
4.6.3 Plagas y enfermedades	31
4.7 Gulupa	31
4.7.1 Principales Características	32
4.7.1.2 Ciclo Fenológico	32

4.7.2 Requerimientos Generales Para El Crecimiento Del Cultivo De Gulupa	33
4.7.2.1 Temperatura	33
4.7.2.2 Radiación solar	33
4.7.2.3 Altitud	33
4.7.2.4 Humedad Relativa	33
4.7.3 Plagas y enfermedades	34
4.8 Género <i>Fusarium</i>	35
4.8.1 Ciclo de Vida de <i>Fusarium spp</i>	35
4.8.2 Fusariosis Vascular O “Secadera”	36
4.9 Caracterización Molecular de Hongos	37
4.9.2 Reacción En Cadena De La Polimerasa	37
4.9.3 Espaciadores de transcripción interna (ITS)	38
4.9.2 Electroforesis	38
4.10 Control Biológico	38
4.11 Antagonismo	40
5.0 DISEÑO METODOLÓGICO	41
5.1 Universo	41
5.2 Población	41
5.3 Muestra	41
5.4 Tipo de estudio	42
5.5 Hipótesis	42
5.6 Variables	43
5.6.1 Variables Dependientes	43
5.6.2 Variable Independiente	43
5.7 Indicadores	43
5.7.8 Técnicas y procedimientos	44
5.8.1 Primera fase: Obtención de los patógenos y posibles controladores	44
5.8.1.1 Toma de Muestras	44
5.8.1.2 Aislamiento Inicial	47

5.8.1.3 Segundo Aislamiento	47
5.8.2 Segunda fase: Identificación microbiológica de bacterias como posibles controladores biológicos	48
5.8.3 Tercera fase: Identificación Microbiológica y Molecular de Patógenos	48
5.8.3.1 Extracción de ADN de Patógenos Aislados	48
5.8.3.2 Amplificación de ADN por PCR	50
5.8.3.3 Secuenciación del material amplificado	52
5.8.4 Cuarta Fase: Pruebas In Vitro	52
5.8.4.1 Pruebas <i>in vitro</i> para Determinar Antagonismo	52
6. RESULTADOS	53
6.1 Primera fase	53
6.2 Segunda Fase: Identificación De Biocontroladores Por Microbiología Convencional	66
6.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL PATÓGENO	70
6.4 SECUENCIACIÓN	70
6.5 ANTAGONISMO <i>In vitro</i>	71
7. DISCUSIÓN	81
8. CONCLUSIONES	89
9. RECOMENDACIONES	90
10.REFERENCIAS	91
11. ANEXOS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Granadilla	26
Figura 2. Curuba	27
Figura 3. Badea	27
Figura 4. Maracuyá	28
Figura 5. Etapas fenológicas de la Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)	29
Figura 6. Gulupa	32
Figura 7. Etapas fenológicas de la Gulupa (<i>Passiflora edulis</i> Sims)	32
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Fusarium</i> spp	36
Figura 9. Recolección de muestras de material vegetal y suelo en fincas de Pasca Cundinamarca	46
Figura 10. Preparación de diluciones seriadas de las muestras de suelo y siembra de muestras con material vegetal	47
Figura 11. Identificación microbiológica de biocontroladores por medio de pruebas bioquímicas en tubo	48
Figura 12. Extracción de ADN “Wizard Genomic DNA Purification Kit” con nitrógeno líquido.	50
Figura 13. Electroforesis.	51
Figura 14. Enfrentamiento dual entre patógeno y dos biocontroladores. control positivo	52
Figura 15. Agar Sabouraud Dilución 10^{-4} (Mx1)	53
Figura 16. Agar Sabouraud Dilución 10^{-4} (Mx 2)	53
Figura 17. Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Mx1).	53
Figura 18. Agar PDA Dilución 10^{-1} (Mx 2).	53
Figura 19. Agar BHI Dilución 10^{-3} (Mx1)	54
Figura 20. Agar PDA Dilución 10^{-2} (Mx 2)	54
Figura 21. Agar PDA Dilución 10^{-1} (Mx1)	54
Figura 22. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx 2)	54
Figura 23. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx1).	54
Figura 24. Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Mx 2)	54
Figura 25. Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Mx3)	55

Figura 26. Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Mx4)	55
Figura 27. Agar BHI Dilución 10^{-2} (Mx3)	55
Figura 28. Agar BHI Dilución 10^{-2} (Mx4)	55
Figura 29. Agar BHI Dilución 10^{-3} (Mx3)	55
Figura 30. Agar PDA Dilución 10^{-1} (Mx4).	55
Figura 31. Agar PDA Dilución 10^{-1} (Mx5).	56
Figura 32. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx5).	56
Figura 33. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx6).	56
Figura 34. Agar BHI Dilución 10^{-3} (Mx6)	56
Figura 35. Agar Sabouraud (Mx7)	56
Figura 36. Agar BHI (Mx7)	56
Figura 37. Agar BHI (Mx 8)	57
Figura 38. Agar Sabouraud (Mx 8).	57
Figura 39. Agar BHI (Mx 9)	57
Figura 40. Agar PDA (Mx9)	57
Figura 41. Agar Sabouraud (Mx 10)	58
Figura 42. Agar BHI (Mx 10).	58
Figura 43. Agar BHI Dilución 10^{-2} (Mx1).	58
Figura 44. Agar BHI Dilución 10^{-3} (Mx1)	58
Figura 45. Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Mx1)	59
Figura 46. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx1)	59
Figura 47. Agar BHI Dilución 10^{-2} Mx2)	59
Figura 48. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx 2)	59
Figura 49. Agar Sabouraud Dilución 10^{-4} (Mx3)	59
Figura 50. Agar BHI Dilución 10^{-2} (Mx4)	59
Figura 51. Agar BHI Dilución 10^{-3} (Mx 4)	60
Figura 52. Agar BHI Dilución 10^{-3} (Punto 1) (Mx4)	60
Figura 53. Agar BHI Dilución 10^{-1} (Mx 5)	60
Figura 54. Agar BHI Dilución 10^{-2} (Mx5)	60
Figura 55. Agar Sabouraud Dilución 10^{-4} (Mx5)	60
Figura 56. Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Mx5)	60
Figura 57. Agar BHI Dilución 10^{-2} (Mx 6)	61
Figura 58. Agar BHI Dilución 10^{-3} (Mx 6)	61

Figura 59. Agar BHI (Mx7)	61
Figura 60. Agar BHI (Mx7)	61
Figura 61. Agar BHI (Mx8)	61
Figura 62. Agar BHI (Mx9)	61
Figura 63. Agar BHI (Mx 10)	62
Figura 64. Agar PDA Dilución 10^{-1} (Mx1)	62
Figura 65. Agar PDA Dilución 10^{-1} (Mx1)	62
Figura 66. Agar PDA Dilución 10^{-1} (Mx1)	62
Figura 67. Agar Sabouraud Dilución 10^{-3} (Mx 2)	62
Figura 68. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx 3)	63
Figura 69. Agar PDA Dilución 10^{-4} (Mx 3)	63
Figura 70. Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Mx 3)	63
Figura 71. Agar PDA Dilución 10^{-1} (Mx 4)	63
Figura 72. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx 5)	63
Figura 73. Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Mx 6)	63
Figura 74. Agar PDA Dilución 10^1 (Mx 6)	64
Figura 75. Agar PDA Dilución 10^{-3} (Mx 6)	64
Figura 76. Agar BHI (Mx 8)	64
Figura 77. Agar Sabouraud (Mx 10)	64
Figura 78. PB01	66
Figura 79. PB02	66
Figura 80. PB03	66
Figura 81. PB04	66
Figura 82. PB05	67
Figura 83. PB06	67
Figura 84. PB07	67
Figura 85. PB08	67
Figura 86. PB09	67
Figura 87. PB10	67
Figura 88. PB11	68
Figura 89. PB12	68
Figura 90. PB13	68

Figura 91. Imagen de “Molecular imagen Gel Doc XR” de marca BIO-RAD, al finalizar la electroforesis. El primer pozo tiene el peso molecular de 1000 pb, el pozo 2 y 3 control negativo, del pozo 3 en adelante se encuentran las muestras.	70
Figura 92. Antagonismo 1 en medio PDA. Patógeno: F2B biocontroladores PB01 y PB02	72
Figura 93. Antagonismo 1 en medio Sabouraud, Patógeno F2B y biocontroladores PB01 y PB02.	72
Figura 94. Antagonismo 1 en medio BHI, Patógeno F2B biocontroladores PB01 PB02	72
Figura 95. Antagonismo 2 en medio PDA, patógeno la F1A, biocontroladores PB03 y PB04	72
Figura 96. Antagonismo 2 en medio Sabouraud, patógeno F1A, biocontroladores PB03 PB04	72
Figura 97. Antagonismo 2 en medio BHI, patógeno F1A, biocontroladores PB03 PB04	72
Figura 98. Antagonismo 3 en medio PDA, patógeno F14, biocontroladores PB05 PB06	72
Figura 99. Antagonismo 3 en medio Sabouraud, patógeno F14, biocontroladores PB05 PB06	72
Figura 100. Antagonismo 3 en medio BHI, patógeno F14, biocontroladores PB05 PB06.	72
Figura 101. Antagonismo 4 en medio PDA, patógeno F3, biocontroladores PB07 PB08.	73
Figura 102. Antagonismo 4 en medio Sabouraud, patógeno F3 biocontroladores PB07 PB08.	73
Figura 103. Antagonismo 4 en medio BHI, Patógeno F3 biocontroladores PB07 y PB08.	73
Figura 104. Antagonismo 5 en medio PDA, patógeno F4 biocontroladores PB09 y PB10	73
Figura 105. Antagonismo 5 en medio Sabouraud, patógeno F4, biocontroladores PB09 PB10	73
Figura 106. Antagonismo 5 en medio BHI, patógeno F4 biocontroladores PB09 PB10.	73

Figura 107. Antagonismo 6 en medio Sabouraud, patógeno F5A, biocontroladores PB11, PB12	73
Figura 108. Antagonismo 6 en medio BHI, patógeno F5A, biocontroladores PB11, PB12	73
Figura 109. Antagonismo 6 en medio PDA, Patógeno F5A, biocontroladores PB11 PB12.	74
Figura 110. Antagonismo 7 en medio PDA, patógeno F1B, biocontroladores PB13 PB06	74
Figura 111. Antagonismo 7 en medio Sabouraud, patógeno F1B, biocontroladores PB13 y PB06	74
Figura 112. Antagonismo 7 en medio BHI, patógeno F1B, biocontroladores PB13 PB06.	74
Figura 113. Antagonismo 8 en medio PDA, patógeno F2A biocontroladores PB02 PB09.	74
Figura 114. Antagonismo 8 en medio Sabouraud, patógeno F2A biocontroladores PB02 PB09	74
Figura 115. Antagonismo 8 en medio BHI, patógeno F2A biocontroladores PB02 PB09.	74
Figura 116. Antagonismo 9 en medio PDA, Patógeno F5B biocontroladores PB01 y PB12	74
Figura 117. Antagonismo 9 en medio Sabouraud, patógeno F5B biocontroladores PB01 PB12	74
Figura 118. Antagonismo 9 en medio BHI, patógeno F5B biocontroladores PB01 PB12.	74
Figura 119. Antagonismo 10 en medio PDA, Patógeno F9, y como biocontroladores la muestra PB05 y PB08	75
Figura 120. Antagonismo 10 en medio Sabouraud, patógeno la muestra F9, biocontroladores PB05 PB08	75
Figura 121. Antagonismo 10 en medio BHI, Patógeno F9, biocontroladores PB05 PB08	75
Figura 122. Antagonismo 11 en medio PDA, Patógeno F12 Biocontroladores PB07 PB10	75

Figura 123. Antagonismo 11 en medio Sabouraud, Patógeno F12 Biocontroladores PB07 y PB10.	75
Figura 124. Antagonismo 11 en medio BHI, patógeno F12 biocontroladores PB07 PB10	75
Figura 125. Antagonismo 12 en medio PDA, Patógeno F13, biocontroladores PB11 PB09.	75
Figura 126. Antagonismo 12 en medio BHI, patógeno F13, biocontroladores PB11 PB09.	75
Figura 127. Antagonismo 12 en medio BHI, patógeno F13, biocontroladores PB11 PB09	75
Figura 128. Antagonismo realizado en agar PDA, enfrentando los patógenos contra las bacterias biocontroladoras. Figura elaborada por las autoras	78
Figura 129. Antagonismo realizado en agar Sabouraud, enfrentando los patógenos contra las bacterias biocontroladoras.	79
Figura 130. Antagonismo realizado en agar BHI, enfrentando los patógenos contra las bacterias biocontroladoras.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales Plagas y Enfermedades que Afectan el Cultivo de Maracuyá	29
Tabla 2. Principales Plagas y Enfermedades que Afectan el Cultivo de Gulupa	33
Tabla 3. Criterios de Inclusión y Exclusión para Fincas, Muestras de Suelo y Muestras de Material Vegetal	39
Tabla 4. Indicadores	41
Tabla 5. Orden de Toma de Muestra y Descripción de las Fincas	42
Tabla 6. Especificación Ciclos y Temperatura para PCR	48
Tabla 7. Primera siembra de microorganismos Encontrados en Muestras de Suelo y Material Vegetal	52
Tabla 8. Identificación morfológica por medio de la tinción de Gram de los microorganismos encontrados en las muestras en estudio.	57
Tabla 9. Identificación morfológica por medio de la tinción de azul de lactofenol a los microorganismos encontrados en las muestras en estudio.	61
Tabla 10. Aislamiento final de patógenos y posibles controladores biológicos.	63
Tabla 11. Identificación morfológica por tinción de Gram de bacterias aisladas.	65
Tabla 12. Pruebas Bioquímicas para Identificación de Bacterias	68
Tabla 13. Identificación de Bacterias por pruebas rápidas, BBL Crystal	69
Tabla 14. Resultados de la comparación realizada con la base de datos BLAST de los 13 patógenos aislados	70
Tabla 15. Pruebas de antagonismo	71
Tabla 16 Diámetro de crecimiento de los patógeno frente a cada biocontrolador	75



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

**DETERMINACIÓN DEL PATÓGENO CAUSANTE DE “LA SECADERA” EN
CULTIVOS DE PASIFLORAS Y SU POSIBLE CONTROL BIOLÓGICO EN
FINCAS, MUNICIPIO DE PASCA- CUNDINAMARCA**

Los cultivos de Gulupa y Maracuyá, son cada vez más importantes para la agricultura colombiana, debido al aumento en la exportación a diferentes países. La enfermedad más limitante es la Fusariosis Vascular o “Secadera”, causando pérdidas hasta 80 % en la producción. El patógeno es *Fusarium* sp., éste ataca a nivel vascular. El objetivo de este estudio fue establecer la identidad del microorganismo patógeno causante de la secadera en los cultivos de Pasifloras ubicado en Fincas en el Municipio de Pasca - Cundinamarca y, los posibles controladores microbiológicos, que pudieran tener un efecto controlador del hongo. La metodología incluyó un muestreo de 4 fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca de suelo y material vegetal de cultivos de Gulupa y Maracuyá con sintomatología, pruebas de identificación fenotípica y genotípica de los hongos aislados y pruebas de antagonismo *in vitro* de las bacterias aisladas contra los patógenos. Se identificaron 12 hongos del género *Fusarium* por medio de clave dicótoma utilizando las características macroscópicas y microscópicas y se confirmó su identidad por medio de pruebas de biología molecular. Adicionalmente, se aislaron 13 bacterias y se identificaron por pruebas bioquímicas en tubo y BBL

Crystal, de las cuales, 11 fueron del género *Bacillus* sp, una *Pseudomonas* sp y un *Staphylococcus* sp,. Las pruebas de antagonismo demostraron que 3 bacterias del género *Bacillus* tienen una alta capacidad de controlar el crecimiento de *Fusarium*. A futuro, es necesaria una prueba en campo controlada, para establecer la verdadera capacidad de biocontrol que tengan las bacterias con alta capacidad antagónica frente a los *Fusarium*.

PALABRAS CLAVES: patógeno, biocontroladores, *pasifloras*, Gulupa, Maracuyá, *Fusarium*.

Estudiantes Karen Sabine Medina Garzón, Lizeth Geraldine Galindo Guerrero.

Docentes: Ligia Consuelo Sánchez, M. Sc

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Fecha: 12 de Abril 2019

1. INTRODUCCIÓN

Las Pasifloras se encuentran clasificadas dentro de la familia de las *Passifloraceae*; son nativas de la cordillera de los Andes y el continente africano. Su siembra es originaria de Colombia, Ecuador y Venezuela. Su principal exponente, el género *Passiflora*, incluye, Curuba (*Passiflora mollissima* Bailey), Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Sims) y Gulupa (*Passiflora edulis* Sims)¹. Estas dos últimas serán el centro de estudio en la presente investigación.

Actualmente, los cultivos de pasifloras están en aumento por sus buenas propiedades organolépticas y son ampliamente utilizados en la gastronomía. Colombia comenzó a incursionar en este mercado a mediados de los años 60s, ubicándose dentro de los países del mundo que más siembra y cosecha pasifloras, aunque para esta época su exportación era poca. Sin embargo, para dar respuesta al consumo interno, fue necesario importar de otros países como Ecuador. Pero Colombia dejó de importar Pasifloras y comenzó a exportar estos frutos a la Unión Europea, Canadá y Países Bajos principalmente, aumentado, así, la exportación, al pasar de 4.908 toneladas en 2014 a 7486 toneladas en 2017 y la importación disminuyó, teniendo 1.045 toneladas en 2014 a 0.23 toneladas en el año 2017 ².

La producción de Pasifloras en Colombia está ampliamente distribuida en 24 departamentos y 422 municipios con más de 15.000 hectáreas sembradas, siendo los principales departamentos productores; Huila con 53.271 toneladas (Maracuyá, Gulupa, Granadilla, Badea, Cholupa y Curuba), Antioquia con 52.031 toneladas (Maracuyá, Gulupa, Granadilla y Curuba), Meta con 34.588 toneladas (Maracuyá), Valle del Cauca 14.934 toneladas (Maracuyá, Gulupa, Granadilla y Curuba) y Boyacá 9.682 con toneladas (Gulupa, Granadilla y Curuba) para Abril del año 2018.²

Las variedades del género *Passiflora* pueden ser afectadas por diversas enfermedades que llegan a perjudicar distintas partes de la planta, causando grandes pérdidas en la producción de los cultivos. Actualmente, se conocen 16 enfermedades asociadas con bacterias, nematodos, virus y hongos. En este último grupo, se encuentra “La Secadera” una de las enfermedades más comunes y

peligrosas para estos cultivos, el hongo *Fusarium* spp, es el causante de la enfermedad que afecta la parte vascular de la planta y puede llegar a causar pérdidas entre el 20 y 100% en los cultivos ³.

Para el año 2015, en el departamento del Valle del Cauca, se reportaron diferentes especies de *Fusarium* generaron pérdidas del 5 al 15% por área sembrada en cultivos de Maracuyá ⁶⁶. En cuanto a los cultivos de Gulupa, se estiman pérdidas del 25 al 30% en productos exportables, en este mismo año.

Para el control de esta enfermedad, se han utilizado diversos métodos preventivos como productos cicatrizantes, yodo agrícola o hipoclorito de sodio al 2%; también, productos químicos como la Cal mezclado con benomil, teniendo como requisito el suelo sin siembra por 6 meses. Aun así, no se tiene aún un método que sea óptimo y puede mitigar el efecto que tiene *Fusarium* spp sobre estos cultivos ⁴.

Por tal razón, la investigación tuvo como objetivo la identificación fenotípica y genotípica del patógeno causante de “la secadera”, en cultivos de pasifloras (Gulupa y Maracuyá) en fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca. Adicionalmente, en la metodología se hicieron aislamientos de microorganismos bacterianos de tejidos sanos y suelos obtenidos de 4 fincas del municipio de Pasca Cundinamarca. Se aislaron 12 patógenos y se identificaron por medio de biología molecular 8 de estos, los cuales corresponden a: *Fusarium oxysporum* 4, *Fusarium solani* 2, *Phoma* spp 1 y *Epicoccum nigrum* 1. Con los bioensayos *In vitro* se pudo concluir que 4 bacterias presentaron alta actividad antagónica ya que, reducen el crecimiento de los patógenos. Por lo anterior, estas bacterias pueden ejercer algún control biológico disminuyendo el crecimiento de *Fusarium* y mitigar el efecto del patógeno sobre la planta, ofreciendo a los agricultores un método que no afecte la salud de las personas y sea amigable con el ambiente, sin afectar la microbiota existente en las plantas y al ecosistema en general, que habita en este medio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la identidad de los microorganismos patógenos causantes de la secadera en los cultivos de Pasifloras ubicados en Fincas en el Municipio de Pasca, Cundinamarca y, los posibles controladores microbiológicos, que puedan servir como alternativa amigable para solucionar el problema fitosanitario presente en los cultivos en estudio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar el o los patógenos que están causando la secadera en los cultivos de Gulupa y Maracuyá, en fincas ubicadas en el municipio de Pasca-Cundinamarca.
- Identificar microorganismos como posibles controladores por medio de pruebas microbiológicas y su actividad antagónica mediante bioensayos *In vitro* frente a patógenos que están causando la secadera en los cultivos de Gulupa y Maracuyá.
- Verificar la identidad del o los microorganismos patógenos aislados de Gulupa y Maracuyá provenientes de Pasca - Cundinamarca Por medio de técnicas de biología molecular

3. ANTECEDENTES

El aumento en la producción de pasifloras en Colombia es de gran importancia para la economía del país, ya que este gremio favorece a cultivadores de distintos departamentos como Huila, Tolima, Meta, Boyacá y Cundinamarca, Antioquia, Caldas, Quindío, Risaralda Cauca y Nariño.

Aunque las pasifloras son un género que abunda en América del Sur, el cultivo para producción se inició en África. Los primeros estudios para la determinación de *Fusarium* spp como agente causal de la secadera, se realizaron en el año de 1992 en Zimbabwe, donde Cole et al, hicieron una recolección de muestras en distintas granjas del país, que tuviesen cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) y Maracuyá (*Passiflora edulis*), que presentaran una decoloración en el tallo. Al tomar las muestras se sembraron en tres medios de cultivo: Nash Médium (NM), agar sacarosa de papa (PSA), agar zanahoria de patata (PCA) y NM, en los cuales hubo crecimiento de *Fusarium solani* como agente causante de la secadera, además de encontrar una coinfección con *Phytophthora nicotianae* var. parasitica, e hicieron que las plantas infectadas con los dos microorganismos tuvieran una muerte más rápida, que las plantas que estaban solo con *Fusarium solani*.⁵

Con la entrada de las pasifloras a Colombia en los años 60s y el aumento de estos cultivos en la agricultura nacional, en el año 2008, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, ahora AGROSAVIA, decide estudiar todo lo referente a la secadera específicamente en cultivos de Maracuyá en el municipio de Huila. Se ha establecido que esta especie de pasiflora es la más susceptible a morir a causa de esta enfermedad. Esta investigación, se realizó con el fin de mejorar el estado fitosanitario de los cultivos de Maracuyá en la región. En el estudio se muestrearon 27 fincas del municipio, se obtuvieron 71 aislamientos, 70 correspondieron a cepas de *Fusarium* spp y un aislamiento correspondió a una cepa de *Verticillium* spp, los cuales se colocaron en pruebas de patogenicidad utilizando plántulas de Maracuyá, mostrando una agresividad del 66 y 100%. Para contrarrestar el efecto, se utilizaron distintos métodos no convencionales como el uso de microorganismos, *Trichoderma* spp y extractos vegetales con diversas plantas. Los métodos fueron efectivos para la prevención y control del crecimiento del hongo, en los cultivos de Maracuyá.⁶

En el año 2009, se siguen las investigaciones para la búsqueda de alternativas para dejar atrás los métodos químicos; los investigadores Suárez y Fernández de la Universidad Nacional de Colombia, se enfocaron en buscar una solución para el problema de marchitez y se evaluó *Trichoderma harzianum* contra *Fusarium*. Se utilizaron 6 aislamientos de *Trichoderma harzianum* sobre el patógeno y evaluaron 3 aislamientos comerciales (TCC-001, TCC-005 y TCC-006) y 3 aislamientos nativos de suelo cultivado con palma de aceite en el Centro de Investigación Caribia de Corpoica. Se hizo la prueba *in vitro* de las muestras en Agar Sabouraud. Se evaluó competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial, por 10 días a 28°C. Todos los aislamientos de *T. harzianum* superaron en crecimiento a *F. oxysporum* con radios de 7,42 cm en cultivo dual. Mientras que el patógeno *Fusarium* spp mostró un radio de 1,99 cm. Como en el estudio de Corpoica, el género *Trichoderma* es uno de los microorganismos con mejor antagonismo frente a *Fusarium* spp ⁷.

En el año 2012, los investigadores Ortiz y Hoyos, realizaron una investigación, que tuvo como objetivo mostrar las diferencias en síntomas de infección causada por *F. oxysporum* y *F. solani* en cultivos de Gulupa en Colombia. Se tomaron diferentes muestras de plantas que presentaban marchitez, clorosis, decoloración vascular y pudrición en el tallo y se determinó que la infección por *Fusarium oxysporum* se caracteriza por el retraso en el crecimiento y la clorosis en las ramas y la coloración rojiza que toman los haces vasculares. Por otro lado, *Fusarium solani*, causó pudrición de tallo, decaimiento y clorosis de las ramas que van acompañadas de cuarteamiento de la corteza o pardeamiento del cuello; posteriormente, se produce necrosis y marchitamiento en cuello. En conclusión, la principal diferencia entre los patógenos que fueron estudiados se basa en que *Fusarium solani* no va producir cambios de color en los haces vasculares ⁸.

En este mismo año (2012), Ocampo y Wyckhuys, establecieron que hay limitaciones en la identificación de las principales enfermedades que afectan los cultivos de Gulupa, debido a los pocos estudios que se han realizado en Colombia. El artículo presenta un breve resumen de las enfermedades que sufren los cultivos de Gulupa: roña, secadera, antracnosis y determinan los diferentes signos y síntomas que ocasiona cada patógeno. Además, establecen que es muy importante tener Buenas

Prácticas Agrícolas (BPA), con el fin de minimizar o prevenir estas enfermedades para evitar ya sea la muerte prematura o deterioro del alimento producido. Además, describen los tratamientos que son utilizados en cada una de las enfermedades y sostienen que el control biológico ideal para la secadera es el hongo *Trichoderma* spp⁹.

También en el año 2012, Cruz analiza la respuesta fisiológica de la gulupa con el fin de apaciguar los cambios extremos que sufre la planta cuando es atacada por *Fusarium oxysporum*. Se determinó que algunos procesos se alteran cuando el patógeno está afectando la planta, dentro de los cuales se analizaron los siguientes: intercambio de gases, tasas de crecimiento de las plantas, acumulación de hormonas y metabolitos, producción de enzimas y proteínas. Para realizar la investigación se inyectó *Fusarium spp* en 100 plántulas que tenían 70 días de edad, se dejaron en el invernadero para observar su sintomatología; posteriormente, se sembraron en PDA y se aisló *Fusarium oxysporum*. Para determinar la respuesta fisiológica de las plantas frente al estrés causado por la colonización de este hongo, se realizó la medición de variables relacionadas con el intercambio de gases en las hojas, la emisión de fluorescencia de la clorofila-A, las características dimensionales y respiratorias del sistema radicular, así como determinaciones del contenido de pigmentos en las hojas y de la enzima peroxidasa tanto en hojas como en raíces. Adicionalmente, se identificó la primera respuesta de las plantas durante la patogénesis¹⁰.

En el año 2015, Ferreira y colaboradores realizaron una investigación con extractos vegetales para control de Fusariosis vascular. Se evaluó el efecto de residuos orgánicos *in vitro* e *in vivo* como medida alternativa para el manejo de la Fusariosis en el Maracuyá, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. En este estudio, se evaluaron seis concentraciones *in vitro* en forma de extracto acuoso, e igual número, para la inhibición del crecimiento micelial *in vivo*, incorporados al suelo para el control de *Fusarium*. Los residuos orgánicos utilizados fueron: hojas de eucalipto, bagazo de coco babasú y cáscara de yuca. Se confirmó la patogenicidad de los aislados evaluados, lo que comprobó la presencia de Fusariosis en el Maracuyá amarillo *in vivo*. En el proceso *in vitro*, el extracto de babasú presentó inhibición significativa en la concentración del 6 % y, en los extractos de hojas de

eucalipto y cáscara de yuca la del 10 %. Esta es una alternativa biológica enfocada a prevención de la enfermedad distinta a la microbiología ¹¹.

En 2017, se realizó un trabajo en Brasil en donde se tuvo como objetivo evaluar la respuesta de sensibilidad o resistencia a *Fusarium* en plantas de 14 especies de pasifloras en la etapa de plántula, a través de la inoculación de *F. oxysporum* f. sp. a pasifloras cultivadas en solución nutritiva. Las especies utilizadas en la selección fueron *P. quadrangularis*, *P. nitida*, *P. foetida*, *P. tenuifila*, *P. alata*, *P. setacea*, *P. cincinnata*, *P. mucronata*, *P. micropetala*, *P. suberosa*, *P. morifolia*, *P. eichleriana*, *P. edulis* y *P. coccinea*. Se inocularon cuatro plántulas de cada genotipo mediante la inmersión de las raíces en una suspensión de 1×10^6 esporas mL⁻¹ durante 24 horas y luego se trasplantaron en macetas con solución nutritiva. Las plantas fueron evaluadas diariamente durante 40 días por la ocurrencia de síntomas de marchitez y muerte. Se midieron el período de supervivencia y la tasa de mortalidad. El método de inmersión de las raíces durante 24 horas y el reemplazo del suelo por solución nutritiva fueron eficientes para distinguir los genotipos resistentes. Hubo variabilidad intraespecífica en relación con la enfermedad. Las especies más resistentes fueron *P. foetida*, *P. mucronata*, *P. nitida* y *P. morifolia* ¹².

Se concluye además con estos antecedentes, la importancia de caracterizar la especie de *Fusarium* que está produciendo la “secadera” en las diferentes variedades, por cuanto la virulencia puede variar de acuerdo a la variedad vegetal y tipo de fitopatógeno. Como proceso adicional encontrar posibles microorganismos que tengan actividad antagonista y controladora para cada una de las especies, o para todas, si esto fuera posible.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 Generalidades de las Pasifloras

“La familia de las pasifloras está constituida aproximadamente por 600 especies, las cuales se encuentran distribuidas entre zonas tropicales y subtropicales. El término Pasifloras fue otorgado por misioneros españoles debido a la morfología de las flores, por su parecido con la imagen de la pasión de Cristo. Gran parte de los géneros son originarios de África oriental y solo 5 géneros de América”. Se sabe que hay aproximadamente 500 especies que pertenecen al género *Passifloras* de las cuales son de gran importancia a nivel productivo la Granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) y Curuba (*Passiflora mollissima* Bailey)².

4.1.1 Clasificación Taxonómica de las *Passifloras*

TAXONOMÍA DE LAS PASIFLORAS

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Violales

Familia: Passifloraceae

Tribu: Passiflorae

Género: *Passiflora*

Tomado de USDA (United States Department of agriculture) ¹³. Agrupado por el autor.

4.1.2 Requerimientos para el Desarrollo de las *Passifloras*

Los requerimientos generales para el crecimiento de Pasifloras de origen americano son: rango climático entre 5 y 35°C, altura aproximada de 3800 msnm, humedad moderada, no toleran las heladas; deben recibir sol directo y estar protegidas de

vientos fuertes y fríos ¹⁴. Otro parámetro importante es la radiación solar, esta influye en el tamaño, calidad de los frutos y la coloración del mismo. Así mismo, la luminosidad influye en la floración de la planta. Sin embargo, cada pasiflora tiene sus propios requerimientos para un óptimo crecimiento.

4.2 Producción De Las Pasifloras En Colombia

La información sobre la situación colombiana del comportamiento de la producción de pasifloras, se obtuvo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y Secretarías de Agricultura, a través de bases estadísticas como AGRONET (2012) y la base Agrícola Nacional 2007-2011 p, CCI (2012).

La producción de pasifloras en Colombia tuvo una tasa de crecimiento de 5.1%, incrementando de 12.36 toneladas sembradas (2011) a 15.158 toneladas sembradas (2016) y de 9.749 toneladas cosechadas (2011) a 11.052 toneladas cosechadas (2016), con una tasa de crecimiento de 2.5%. Adicionalmente, las frutas de este género con mayor producción en el año 2016 fueron: Maracuyá con 7.801 toneladas por hectárea sembrada, Granadilla 6.007 toneladas por hectáreas sembrada y por último Gulupa que generó 1.191 toneladas por hectárea ¹⁵.

Para el año 2017, la Maracuyá se posiciona como una de las pasifloras de mayor consumo a nivel nacional con un 8%. Como esta cifra no es muy alta, se comenzó la exportación de estas frutas generando así, un 5,8% la exportación de Gulupa del total de la exportación hortofrutícola colombiana ¹⁵.

Todas las pasifloras tienen requerimientos de crecimiento diferentes para su cultivo, como, la altura sobre el nivel del mar, clima, humedad, terreno. A continuación, se citan ciertas características en relación a cuatro de las variedades de Pasifloras, como modelo, por cuanto el tema que acoge este proyecto es las enfermedades y plagas, específicamente, *Fusarium*, tema que se profundiza más adelante.

4.3. Granadilla

La granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), es originaria de la cordillera de los Andes, cultivada principalmente en Colombia. Pertenece a la familia *Passifloraceae*, considerada como una planta “trepadora”. Sus frutos poseen semillas rodeadas por un arilo dulce. Esta es una planta que se puede propagar por distintos métodos, tales como el sexual (semillas) o vegetativos (estacas, injertos, cultivos in vitro)¹⁶; en Colombia, generalmente es utilizado el método sexual.



Figura 1. Granadilla. Tomado de ⁵⁸

Un aspecto importante el cual requiere de vigilancia y cuidado es la diversidad de plagas y enfermedades que pueden afectar al cultivo en especial en épocas de lluvias. “Dentro de las principales plagas se encuentra; la «mosca del ovario» la cual sirve como puerta de entrada para el hongo *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris en flores y frutos en formación. En los frutos verdes y en maduración son bastante susceptibles a hongos como *Colletotrichum* y *Alternaria*, que su mayoría de especies causan necrosis del tejido vegetal y antracnosis (chancro)”. En épocas de invierno la humedad sube llevándose algunos nutrientes necesarios y agotando el oxígeno de las raíces por lo que se van a generar lesiones en las hojas como la clorosis; en las raíces favorece el crecimiento de hongos que pueden afectar de forma vascular, aquí aparece *Fusarium* spp, causando la enfermedad conocida como “Secadera” ¹⁶.

4.4 Curuba

Passiflora tripartita, también conocida comúnmente como Curuba, es originaria de los Andes, se produce en los municipios de Boyacá, Cauca, Cundinamarca y Nariño. “Se caracteriza por ser una enredadera de tallo muy veloso, su flor es de

sus mayores atractivos por tener pétalos rojos y oblongos”¹⁷. Con relación a la tolerancia a la temperatura, prefiere el clima frío, en una altura de 2000 a 3000 m.s.n.m y preferiblemente entre 10 a 18°C. No soporta heladas y vientos fuertes causan volcamientos a las plantas y el cultivo puede verse afectado.

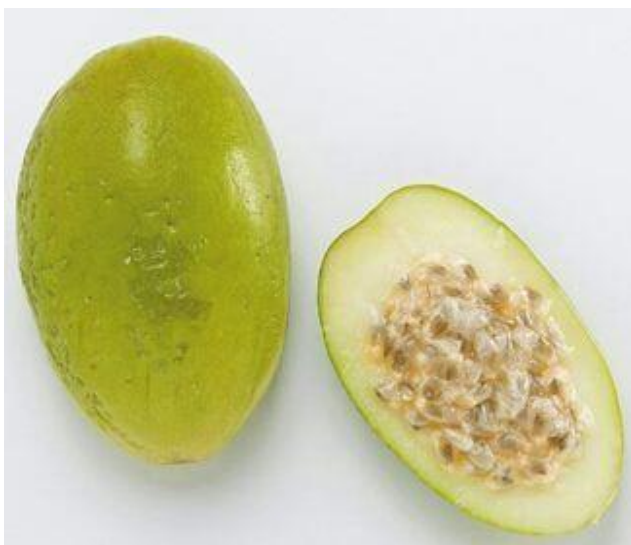
Como parte del Manejo Integrado de plagas, se realizan controles culturales como la



poda, que se hace una vez florece y fructifica. El cultivo de curuba debe mantenerse sin malezas. Las principales plagas y enfermedades son gusanos, trozadores, escamas y trips. Se reportan problemas de antracnosis, mancha parda y marchitamiento de la raíz, este último producido por *Fusarium*¹⁷.

Figura 2. Curuba. Tomado de ⁶⁰

4.5 Badea



Passiflora quadrangularis, más conocida comúnmente como badea. Es una planta trepadora que mide de 5 a 50 m de largo, posee frutos verdes amarillentos, lisos, miden de 22,5-35 cm de largo y 0,15 a 0,22 cm de grosor. Dentro de las plagas que más afectan la Badea están, coquito rayado, hormigas arrieras, trips, mancha foliar (*Alternaria passiflorae*)¹⁸.

Figura 3. Badea. Tomado de ⁶¹

4.6 Maracuyá

El Maracuyá (*Passiflora edulis L*), originaría de la Amazonía Brasileña, se caracteriza por ser una enredadera, de tallos redondos, hojas ovadas-oblongas, gruesas, de unos 5-8 cm. de largas, presentan un color rojizo, rosado o púrpura, los frutos son redondos u ovoides de 3-7 cm de diámetro, con cáscara dura de 3-10 mm de grosor. En su madurez son de color amarillo claro, la pulpa es blanca amarillenta y agri dulce con múltiples semillas de color negro ¹⁹.



Figura 4. Maracuyá. Tomado de ⁶²

4.6.1 Principales Características

4.6.1.1 Ciclo Fenológico

El tiempo de desarrollo del cultivo de Maracuyá en condiciones óptimas dura 20 meses los cuales están comprendidos en tres etapas: La primera es la etapa vegetativa, va desde la germinación de la semilla hasta el momento de la floración. Posteriormente sigue la etapa reproductiva, inicia con la floración y culmina con la formación del fruto. Cada cosecha grande tiene una duración de dos meses, intercalados con dos cosechas pequeñas de cuatro meses. Finalmente, la etapa productiva va desde la formación del fruto, hasta la cosecha que abarca la etapa de la vida útil del cultivo que oscila entre dos y tres años, dependiendo de las buenas prácticas que se le realicen al cultivo ²⁰.



Figura 5. Etapas fenológicas de la Maracuyá (*Passiflora edulis*). Tomado de Manual Técnico del cultivo de Maracuyá bajo Buenas Prácticas Agrícolas ²⁰.

4.6.2 Requerimientos Generales Para El Crecimiento De Maracuyá.

4.6.2.1 Temperatura

Temperatura entre 20 y 30 °C, altitud de 1200 msnm. Dentro de los métodos de propagación puede ser por acodo aéreo o subterráneo, por semillas (Reproducción sexual), siendo este último generalmente el más usado ¹⁶.

4.6.2.1 Radiación solar

La radiación solar tiene bastante influencia en la calidad del fruto, ya que, a una exposición mayor de la parte foliar a la luz solar disminuye el peso, pero aumenta la cantidad de jugo, mayor cantidad de ácido ascórbico, corteza más delgada y sólidos solubles aumentan. Por lo anterior se recomienda una exposición a la luz solar de cinco horas por día ²¹.

4.6.2.3 Altitud

El cultivo de Maracuyá cuenta con un intervalo amplio de altitud que oscila entre 0 y 1300 msnm, creciendo en óptimas condiciones está entre los 300 a 900 msnm ²¹.

4.6.2.4 Humedad Relativa

Los frutos del cultivo de Maracuyá, requieren una humedad relativa alta (60%). Esto, genera en un aumento de peso y aumento en el jugo del fruto, además, de darle mejor aroma y sabor ²¹.

4.6.3 Plagas y enfermedades

Las principales plagas y enfermedades que afectan los cultivos de Maracuyá se relacionan en la Tabla 1.

Tabla 1. PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE MARACUYÁ	
MICROORGANISMO	SÍNTOMAS QUE PRODUCE EN LA PLANTA
<i>Tetranychus urticae</i>, <i>Tetranychus mexicanus</i> y <i>T. desertorum</i>.	Son una plaga de importancia económica, proliferan en los veranos prolongados; atacan las hojas por el envés y prefieren las maduras, que se amarillean y caen, lo que acorta el ciclo productivo de la planta.
<i>Dasiops sp.</i>	Conocida comúnmente como mosca del ovario. Ocasiona la caída de los botones florales, debido a que la hembra ovoposita en el botón floral y las larvas se alimentan de las estructuras internas de la flor.
<i>Trips tabaci</i> L., <i>Trips palmi</i>, <i>Frankliniella occidentalis</i>, <i>Neohydatothrips signifer</i>	Estos insectos se localizan sobre yemas terminales, atrofiando el desarrollo normal de la planta. Además, están asociados con transmisión de virus. Se presentan, aproximadamente 4 meses después del establecimiento del cultivo
<i>Dione juno</i> y <i>Agraulis sp.</i>	Las larvas defoliadoras actúan consumiendo las hojas y las yemas laterales. Aunque atacan en forma masiva, su importancia económica es baja. Se pueden controlar manualmente ya que son fáciles de detectar.
<i>Aphis gossipii</i>	Se ubican en los puntos terminales y causan encrespamiento en las hojas jóvenes. El daño directo es de poca importancia; sin embargo, se ha reportado como vector de enfermedades virales en Maracuyá, que son de importancia económica.
Pudrición del cuello y de las	Los principales síntomas son el amarillamiento gradual de las hojas y el marchitamiento de las plantas, que finalmente mueren. En algunas ocasiones las hojas quedan adheridas al tallo y caen cuando la planta

<p>raíces. “Secadera”.</p> <p><i>Fusarium spp.</i></p>	<p>muere. El patógeno lesiona las plantas adultas a la altura del cuello; la lesión puede rodear todo el tallo dando la apariencia de un collar y allí se desprende la corteza; a veces esta zona se engruesa. En algunos casos las raíces se deterioran y el crecimiento de las raicillas se detiene o es muy escaso.</p>
<p>Antracnosis</p> <p><i>Colletotrichum sp.</i></p>	<p>Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en periodos de lluvia, debido a que es favorecida por la humedad alta y la poca aireación. Este patógeno produce síntomas en todos los órganos de la planta: En las hojas inducen manchas foliares, de apariencia aceitosa en los bordes y con anillos desde el centro hacia afuera. En el centro de la lesión se desarrollan las estructuras reproductivas del hongo. En los frutos las lesiones empiezan como manchas aceitosas que se vuelven lesiones hendidas y luego chancros de color pardo a negro donde hay crecimiento del hongo.</p>
<p>Roña o costra</p> <p><i>Cladosporium sp.</i></p>	<p>La enfermedad se manifiesta en frutos de diferente edad con lesiones verrugosas de color pardo claro. La calidad de los frutos se demerita en su exterior, pero el hongo no afecta su parte interna.</p>
<p>Bacteriosis</p> <p><i>Xanthomonas sp.</i></p>	<p>La bacteria ocasiona inicialmente manchas acuosas que tienen un halo clorótico y una lesión parda en el centro. Las lesiones crecen y las manchas se hacen más grandes llegando a abarcar parte de la lámina foliar. Las hojas se secan y caen prematuramente. En condiciones de alta humedad puede haber defoliación extensa y muerte de las ramas.</p>

Tabla 1. Principales plagas y enfermedades que afectan los cultivos de Maracuyá. Información tomada de Cultivo de Maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) establecido con Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT ²².

4.7 Gulupa

El nombre científico de la Gulupa es *Passiflora edulis* Sims, originaria del continente americano, específicamente de Brasil el siglo XIX de donde se distribuyó hacia otros países del continente, y de allí hasta Asia, el Caribe, África, India y Australia ²³.



4.7.1 Principales Características

4.7.1.2 Ciclo Fenológico

El tiempo aproximado entre siembra y floración del cultivo de Gulupa en óptimas condiciones, dura 180 días (6 meses) y el periodo de producción 420 días.

Figura 6. Gulupa. Tomado de ⁶³

La Gulupa cuenta con 10 etapas dentro de su ciclo fenológico; dentro de los cuales se encuentran: yema floral, flor en antesis, fruto cuajado, fruto con estructuras florales cubriéndolo, fruto inmaduro en crecimiento, fruto en madurez fisiológica, fruto con 30% de coloración púrpura, fruto con 50% de coloración púrpura, fruto con 70% de coloración púrpura y fruto con 100% de coloración ²⁴.



Figura 7. Etapas fenológicas de la Gulupa (*Passiflora edulis* Sims). Tomado de ²⁴

4.7.2 Requerimientos Generales Para El Crecimiento Del Cultivo De Gulupa

4.7.2.1 Temperatura

Para el óptimo crecimiento de este cultivo, es ideal que la temperatura oscile entre 15° a 20°C. Esto influye, en diversas etapas del crecimiento y desarrollo de la planta. A temperaturas bajas en el día de 15°C y en la noche de 10°C, puede afectar el crecimiento de la planta. Así mismo, las altas temperaturas en el día de 30°C y en la noche 25°C, tienden a disminuir la producción floral del cultivo. De igual manera, para que el fruto tenga un peso ideal y este en buen estado para su comercialización, una temperatura adecuada va 21° a 30°C ¹⁴.

4.7.2.2 Radiación solar

La radiación solar influye directamente en la productividad de estos cultivos. Por lo tanto, cuando no reciben buena radiación, por ejemplo; en días nublados se produce un retraso en el crecimiento del cultivo, afectando así, su floración y desarrollo óptimo ¹⁴.

4.7.2.3 Altitud

El rango de altitud para el cultivo de Gulupa está entre 1400 a 3300 msnm, pero su rango óptimo de crecimiento oscila entre 1800 y 2200 msnm. Esto influye en el crecimiento de las plántulas, problemas fitosanitarios, presencia o ausencia de algunas plagas y el tiempo de cosecha. Además, a esta altitud se puede cosechar el fruto en el punto óptimo de cosecha y el 70% de coloración púrpura en la cáscara, pero disminuye el tamaño del fruto, por otro lado, las bajas altitudes la tasa de crecimiento es mínima y no llega a la etapa reproductiva ¹⁴.

4.7.2.4 Humedad Relativa

Un rango óptimo de humedad para el crecimiento y desarrollo de los cultivos de Gulupa oscila entre el 70 y 80%. Se conoce que días muy lluviosos, son capaces de dañar el fruto, perjudicando así su calidad y producción ¹⁴.

4.7.3 Plagas y enfermedades

Las principales plagas y enfermedades que afectan los cultivos de Gulupa, se relacionan en la Tabla 2.

Tabla 2. PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE GULUPA.	
MICROORGANISMO	SÍNTOMAS QUE PRODUCE EN LA PLANTA
Trips <i>Frankliniella sp.</i>	Es una de las plagas más limitantes de la Gulupa. Se alimentan principalmente de estructuras florales y frutos. Se ubican en el envés de las hojas y llegan a causar deformaciones cuando éstas son jóvenes. En los frutos jóvenes ocasionan daños en la epidermis, y raspaduras que facilitan la penetración de algunos patógenos, además de ser vectores de virus. En los brotes jóvenes y meristemos, se observa encrespamiento de tejidos, deformación y reducción en el tamaño de las plantas.
Chisa <i>Ancognata sp</i>	Es un cucarrón (coleóptero) muy común en zonas frías de Colombia, cuyas larvas y adultos se alimentan de las raíces de la Gulupa y de otras plantas.
Nematodos <i>Meloidogyne spp., Helicotylenchus sp., Pratylenchus sp.</i>	Los nematodos producen daños mecánicos en las raíces, nodulaciones, pudriciones, disminución de raíces terciarias y formación de agallas. En el cultivo de Gulupa se observa crecimiento lento del follaje, enanismo, marchitez, defoliación y pérdida general del vigor de las plantas.
Roña o costra <i>Cladosporium cladosporioides, C. lycoperdinum</i>	El hongo se dispersa mediante la lluvia, el viento y herramientas infectadas. En tejidos jóvenes es frecuente observar síntomas de brote. En flores se observan lesiones de color café en sépalos y pétalos. Las lesiones viejas en los frutos presentan una especie de crecimiento algodonoso (micelio) gris verdoso
Marchitez vascular o Fusariosis <i>Fusarium oxysporum</i>	Esta enfermedad es causada, porque el hongo infecta los haces vasculares de la planta causando su taponamiento; como consecuencia, inicialmente se presenta clorosis y luego marchitez gradual, caída de las hojas, arrugamiento de los frutos y, finalmente, la muerte de la planta.
	Esta enfermedad es causada por la infección de la bacteria, principalmente en hojas, tallos y frutos. La infección puede ser localizada, causando lesiones pequeñas de aspecto acuoso

<p>Mancha de aceite o bacteriosis</p> <p><i>Xanthomonas axonopodis</i></p>	<p>tanto en hojas jóvenes como en frutos. En condiciones ambientales favorables, las lesiones se desarrollan y se unen para formar las manchas de aspecto aceitoso. En las hojas, las manchas están rodeadas de halos cloróticos; en los frutos, son blandas dando lugar a pudriciones secundarias de color pardo</p>
--	---

Tabla 2. Principales plagas y enfermedades que afectan los cultivos de Gulupa. Información tomada de Manejo de problemas fitosanitarios del Cultivo de Gulupa ²⁵.

4.8 Género *Fusarium*

Fusarium es clasificado como un Deuteromicetes o también denominado “Hongo imperfecto” debido a que se reproduce de forma asexual, es decir, por esporas, denominadas conidios generados por micelios especializados. Además, también produce clamidosporas que germinan en condiciones de humedad, escasez de nutrientes para comenzar a formar el micelio. Estas esporas son resistentes a diversas condiciones que se encuentran en el ambiente, por lo tanto, esta resistencia facilita su reproducción y propagación a nivel mundial ²⁵.

4.8.1 Ciclo de Vida de *Fusarium spp*

“Los hongos del género *Fusarium* son de gran importancia e interés debido a su amplia distribución mundial, al ser estos microorganismos saprofitos, son capaces de vivir durante amplios periodos de tiempo en el suelo, en las materas, en los estantes, en la rizosfera de la planta, también se pueden diseminar durante el riego de plantas, además tiene una óptima temperatura de reproducción es a 28°C o inclusive menor” ²⁵, por lo tanto, es necesario implementar en los cultivos medidas de prevención en cada proceso que permitan minimizar el riesgo de propagación como: realizar de forma correcta la poda de la planta, evitando el exceso de humedad, hacer de forma correcta el riego, entre otras. Por lo tanto, genera un impacto a nivel agrícola y principalmente a nivel económico en las pasifloras de Colombia ²⁶.

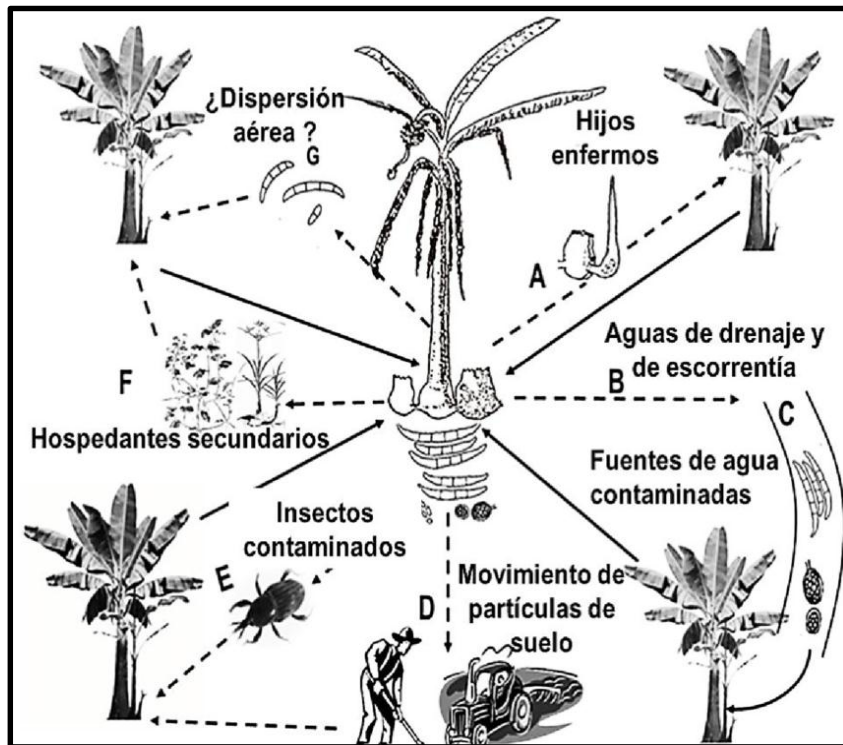


Figura 8: Ciclo de vida de *Fusarium* spp. Tomado de ²⁶.

4.8.2 Fusariosis Vascular O “Secadera”

La Fusariosis vascular también conocida comúnmente como secadera, es una enfermedad en las plantas causada *Fusarium* spp. siendo una de las principales enfermedades en los cultivos de las pasifloras, causando pérdidas económicas a los productores de estas frutas. En la granadilla es una enfermedad que lleva bastante tiempo y hasta el momento se han identificado distintas especies de este hongo, pero el principal agente es un hongo amorfo de *Fusarium solani* denominado *Haematonectria haematococca*, la cual puede sobrevivir mucho tiempo en el suelo y en las sobras de las cosechas por lo que se dice que es muy difícil erradicarlo de un suelo donde hubo una previa infección ²⁷.

La vía de entrada generalmente es por heridas en la raíz o en hojas que pueden ser ocasionadas por insectos, por nematodos o por el hombre el momento de la poda o al recoger la cosecha. Estos viajan hasta llegar a la zona vascular donde van a infectar el Xilema. Esta enfermedad puede atacar en cualquier etapa de crecimiento de la planta, cuando ataca en la etapa de semillero, estas plántulas van a presentar un desarrollo deficiente, las hojas se tornarán amarillas y posterior a esto afecta la

raíz ocasionando la muerte. Cuando la planta está desarrollada se ve la clorosis en las hojas y ese es el primer síntoma que presenta, la literatura manifiesta que los síntomas se van a ver a partir de los 4 a los 6 meses de infección, luego llega al tallo y posteriormente a la raíz generando la muerte de la planta; en la base del tallo una vez muere la planta se puede observar puntos rojos o naranjas los cuales son las formas de reproducción del hongo visibles en la planta infectada ²⁷.

La humedad es uno de los factores que más influyen en el crecimiento de y la infección de este hongo, además de los suelos pesados que tienden a encharcarse o no tienen un buen drenado. Otra fuente grande e importante de infección, es el tipo de agua que se utiliza para el riego de los cultivos, cuando salen de zonas sin un buen tratamiento de agua ²⁸.

Además, posee enzimas que favorecen su patogenicidad, como la lignocelulosa y la cutinasa que intervienen durante el proceso de infección y penetración, degradando la lignina, la celulosa y la cutina, que es la encargada de formar la cutícula de la planta para brindarle protección, logrando así su penetración y posterior infección ²⁹.

4.9 Caracterización Molecular de Hongos

4.9.2 Reacción En Cadena De La Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica molecular la cual consiste en un ensayo enzimático que permite realizar la amplificación de un fragmento específico de ADN. La PCR se puede realizar utilizando el ADN de origen de una variedad de tejidos y organismos, incluidos sangre periférica, piel, cabello, saliva y microorganismos. Solo se necesitan cantidades mínimas de ADN para que la PCR genere suficientes copias para analizarlas utilizando métodos de laboratorio convencionales ³¹. Para llevar a cabo la PCR, se requieren de ciertos componentes que son de vital importancia durante la reacción, como lo son; los cebadores, los nucleótidos (Adenina, timina, citosina y guanina), la ADN polimerasa y la plantilla de ADN que se quiere amplificar.

4.9.3 Espaciadores de transcripción interna (ITS)

El ADN ribosomal de las células eucariotas, compuesto por dos subunidades: 40S y 60S, que está codificado por tres genes (28S, 18S y 5.8S) y a su vez están separados por las regiones de los espaciadores de transcripción interna (ITS) ³². Estos por actuar como intrones no tienen ninguna función biológica, es decir, no van a codificar para ningún aminoácido.

En los últimos 15 años, la identificación molecular de los hongos se ha convertido en un tema de interés en la investigación debido a que ha permitido identificar y analizar la diversidad ecológica de las especies fúngicas. El espaciador transcrito interno (ITS) del ADN han sido útil para llevar a cabo investigaciones durante la identificación de diversos hongos ambientales y han sido estandarizados marcadores de código de barras del ADN fúngico, que permite introducir la secuenciación obtenida en una base de datos y allí lograr identificar los microorganismos fúngicos ³¹.

4.9.2 Electroforesis

La electroforesis es la técnica utilizada para realizar la separación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños moleculares desde 100 pbm hasta 25 kb. Durante la gelificación, los polímeros de agarosa se asocian de manera no covalente y forman una red de haces cuyos tamaños de poros determinan las propiedades de tamizado molecular de un gel. Para separar el ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, el ADN se carga en los pocillos prefabricados en el gel y se aplica una corriente. El esqueleto de fosfato de la molécula de ADN (y ARN) está cargado negativamente, por lo tanto, cuando se coloca en un campo eléctrico, los fragmentos de ADN migran al ánodo cargado positivamente. Debido a que el ADN tiene una relación masa / carga uniforme ³³.

4.10 Control Biológico

La constante implementación de agroquímicos como medida correctiva frente a los problemas fitosanitarios que se presentan en los cultivos, han tomado cada vez más importancia debido a su notable capacidad en la reducción de plagas, evitando así que se aumenten las pérdidas económicas en los cultivos. Sin embargo, la alta

toxicidad que poseen están generando problemas ambientales donde dichos procedimientos son utilizados. Es por eso que el reemplazo de agroquímicos usados frecuentemente por algo más amigable con el medio ambiente como los biocontroladores, pueden ser una buena alternativa al momento de intentar minimizar estos problemas ambientales .³⁴

Por ello, actualmente se desarrollan formulados de agentes de control biológico, es decir, organismos vivos que reducen la población de insectos plaga y patógenos que afectan a los cultivos o depredación. Existen hongos, bacterias y virus antagonistas de los agentes que provocan plagas y enfermedades vegetales. La razón principal por la cual muchos productos agrícolas no son destruidos completamente por las plagas y las enfermedades es la presencia natural de agentes de control biológico: organismos capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, reduciendo sus efectos nocivos ³⁴.

Así como podemos encontrar diferentes tipos de enfermedades, con diferentes características y en distintos ecosistemas, también existen diferentes estrategias de control. Estas por lo general, se diferencian por el tipo de enemigo natural a emplear, esto se debe a como es liberado o manipulado o bien por el resultado inmediato o a largo término del manejo de la plaga.

Se han estudiado algunos mecanismos que están implicados en el control biológico y que, por ende, son usados por los microorganismos controladores, dentro de los cuales están:

Competencia: Existe competencia por nutrientes y competencia por espacio. El primero ocurre cuando dos o más microorganismos tienen un mismo requerimiento nutritivo (Nitrógeno, azúcares, almidón, celulosa, etc.) y uno de estos es usado por un solo organismo lo que aumenta su velocidad de crecimiento. Por otro lado, la competencia por espacio se debe cuando crece a mayor velocidad uno de los microorganismos, ocupando el espacio disponible para los demás. En este mecanismo influyen otros factores externos: tipo de suelo, pH, temperatura y humedad ⁶⁵.

Actividad lítica: La producción de enzimas líticas por parte de los microorganismos biocontroladores como: quitinasas, glucanasas y proteasas principalmente favorecen la degradación de paredes celulares de los microorganismos fitopatógenos ⁶⁵.

Antibiosis: Es la acción directa de metabolitos tóxicos que son producidos por parte de los microorganismos y los fitopatógenos resultan ser sensibles a estos ⁶⁵.

Parasitismo: El parasitismo se da entre dos microorganismos y ocurre cuando uno de estos ataca y toma como alimento al patógeno ⁶⁵.

4.11 Antagonismo

El antagonismo es definido como la competencia que se da entre microorganismos mediante la cual compiten por sus nutrientes, por oxígeno, espacio, así mismo, producen sustancias que alteran el pH del entorno ³⁵.

Es importante comprender el mecanismo de acción de los antagonistas para un mejor uso y para la selección de nuevos antagonistas efectivos. Hasta ahora, los conocimientos sobre los mecanismos de acción involucran: la antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio e inducción de resistencia. Cabe destacar que en general más de un mecanismo puede estar implicado en el efecto de biocontrol ³⁶.

Por todo lo anterior, en la actualidad los microorganismos que tienen actividad antagonista sobre otros, han sido de gran interés en investigaciones debido a que se convierten en buenas alternativas para realizar el control de fitopatógenos ³⁵.

5 DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Universo

El universo de esta investigación son hongos del género *Fusarium* spp. y microorganismos con actividad antagónica y posibilidad de ser controladores biológicos.

5.2 Población

La población son los hongos del género *Fusarium* spp y los microorganismos con posible capacidad antagónica procedentes de cultivos de Gulupa y Maracuyá, de cuatro fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca las cuales se encuentran vinculadas a la Federación Colombiana de Pasifloras.

5.3 Muestra

Hongos del género *Fusarium* spp y microorganismos nativos con posible actividad antagónica o de biocontrol, presente en muestras de suelo y material vegetal de cuatro fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca, Colombia, asociadas a la Federación Colombiana de Pasifloras.

A continuación, se observa en la tabla 3 los criterios de inclusión y exclusión para la toma de la muestra de suelo y material vegetal.

TABLA 3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA FINCAS, MUESTRA DE SUELO Y MUESTRAS DE MATERIAL VEGETAL		
OBJETO DE MUESTRA	CRITERIO DE INCLUSIÓN	CRITERIO DE EXCLUSIÓN
FINCAS	Estar ubicada en el municipio de Pasca Cundinamarca, vinculadas a la Federación Colombiana de Pasifloras.	No estar ubicada en el Departamento de Cundinamarca.
	Tener cultivos de alguna especie de Pasiflora.	No tener cultivo de Pasifloras.

	Tener cultivos mayores de un año.	Tener cultivos menores a un año.
	Tener plantas y cultivos con sintomatología de "Secadera".	No tener sintomatología asociada a "secadera".
SUELO	Cultivos previos con sintomatología asociada a "secadera" o Fusariosis Vascular.	Cultivos previos donde el agricultor no manifieste problemas de secadera.
	Cultivos previos donde el agricultor manifieste problemas continuos de secadera.	
MATERIAL VEGETAL	Cultivos que presentan clorosis y marchitez.	Cultivos que no presentan clorosis y marchitez.

5.4 Tipo de estudio

Este estudio corresponde a una investigación tipo cuantitativa, con diseño descriptivo - experimental.

5.5 Hipótesis

- La secadera es una enfermedad que ataca a los cultivos de Gulupa y Maracuyá en cuatro fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca y el hongo que la produce es *Fusarium* sp. o un conjunto de hongos que hace más difícil su control.
- Algunos microorganismos presentes en el suelo de las plantas de Gulupa y Maracuyá en cuatro fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca, pueden tener acción antagónica y ser posibles controladores biológicos de *Fusarium* sp.

5.6 Variables

5.6.1 Variables Dependientes

La variable dependiente para este estudio son los hongos aislados e identificados del género *Fusarium* sp causantes de “la Secadera” en Pasifloras de cultivos de Gulupa y Maracuyá en el Municipio de Pasca, Cundinamarca y los microorganismos nativos que tienen efecto antagónico frente al hongo *Fusarium* sp, que serán utilizadas como biocontroladores.

5.6.2 Variable Independiente

La variable independiente son las plantas de Gulupa y Maracuyá de cuatro fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca.

5.7 Indicadores

TABLA 4. INDICADORES	
Objetivo	Indicadores
Establecer el patógeno que está causando la secadera en los cultivos de Pasifloras en fincas, ubicadas en el municipio de Pasca-Cundinamarca.	<ul style="list-style-type: none">• Patógeno o patógenos identificados genotípicamente que causen la secadera en Gulupa y Maracuyá en las 4 fincas• Identificación por biología molecular• Microorganismos que tengan capacidad antagónica contra <i>Fusarium</i> aislados de 4 fincas de Pasca Cundinamarca.
Identificar microorganismos como posibles controladores sobre el patógeno que está causando la secadera en los cultivos de Pasifloras.	

Verificar a través de la actividad controladora del patógeno por parte de los microorganismos antagonistas.	
---	--

5.7.8 Técnicas y procedimientos

5.8.1 Primera fase: Obtención de los patógenos y posibles controladores

La obtención de estos microorganismos se realizó de cultivos de Gulupa y Maracuyá en cuatro fincas del municipio de Pasca Cundinamarca en compañía de la Federación Colombiana de Pasifloras.

5.8.1.1 Toma de Muestras

Las muestras se tomaron de suelo y material vegetal (hojas) que tenían sintomatología compatible con “Secadera”, en cultivos de Gulupa y Maracuyá en cuatro fincas del municipio de Pasca Cundinamarca, de acuerdo con la información de la Tabla 5.

TABLA 5. ORDEN DE TOMA DE LAS MUESTRAS Y DESCRIPCIÓN DE LAS FINCAS			
Finca	Descripción	No. Muestra Suelo	No. Muestra Material Vegetal
1	Ubicación: Pasca, Cundinamarca Agricultor: Serafín Mejía Georreferenciación: 4° 19 min 43 seg norte 74° 20 min 12,28 seg oeste Cultivo: Gulupa y Maracuyá Tiempo de cultivo: dos años No. de plantas: 2000 % plantas con secadera: 30%	Muestra 1, Suelo con desinfectante. Punto 1.	Muestra 7, hojas con clorosis y marchitez.
		Muestra 2 sin tratamiento previo. Punto 2	

2	Ubicación: Pasca, Cundinamarca Agricultor: Rosa Campos Georreferenciación: 4° 19 min 43 seg norte 50° 20 min 12,28 seg oeste Cultivo: Gulupa Tiempo de cultivo: dos años No. de plantas: 3000 % plantas con secadera: 20%	Muestra 3, sin tratamiento previo. Punto 1	
3	Ubicación: Pasca, Cundinamarca Agricultor: Guillermo Rojas Georreferenciación: 8° 19 min 43 seg norte 60° 20 min 14,28 Cultivo: Gulupa Tiempo de cultivo: cinco años No. de plantas: 1000 % plantas con secadera: 60%	Muestra 4, sin tratamiento previo. Punto 1	Muestra 8, hojas con clorosis y marchitez
		Muestra 5, sin tratamiento previo. Punto 2	Muestra 9, hojas con clorosis y marchitez
			Muestra 10, hojas con clorosis y marchitez
4	Ubicación: Pasca, Cundinamarca Agricultor: Álvaro Solano Georreferenciación: 10° 19 min 33 seg norte 50° 20 min 18,28 Cultivo: Gulupa y Maracuyá Tiempo de cultivo: Un año No. de plantas: 2450 % plantas con secadera: 30%	Muestra 6, sin tratamiento previo. Punto 2	

Para la toma de las muestras de suelo, se escogieron dos puntos por finca muestreada en los lugares donde se observaba la mayor sintomatología de Secadera, para su recolección se realizó un hoyo en forma de V de 20 cm con ayuda de una pala (la cual utiliza cada uno de los agricultores en sus labores diarias), utilizando el método combinado en Zig Zag. Se recogió 400 g de la muestra, en bolsas con cierre ziploc debidamente marcado, identificando la finca y el sitio donde se tomó (Cada una de las muestras se realizó, con cambio de guantes para evitar contaminar los cultivos).

En el caso del material vegetal, se recolectó aquel material en el que se observó marchitez y clorosis, de los cultivos de Gulupa y Maracuyá de las cuatro fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca. Todos los procesos de recolección fueron supervisados y acompañados por el ingeniero agrónomo, encargado de la zona por la Federación Colombiana de Pasifloras. Ver figura 4.



Figura 9. Recolección de muestras de material vegetal y suelo en fincas de Pasca, Cundinamarca.

Fotos tomas por las autoras

Se muestrearon cuatro fincas con cultivos de Gulupa y Maracuyá del municipio de Pasca, Cundinamarca y se recolectaron seis (6) muestras de suelo y cuatro (4) muestras de material vegetal.

5.8.1.2 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} , agregando 100 uL en Agar Sabouraud y Agar PDA, para favorecer el crecimiento de los Hongos y Agar BHI para el crecimiento de bacterias que más adelante se utilizaron como posibles antagonistas.

Para la siembra del material vegetal, se sembró en los medios de cultivo (Sabouraud, PDA y BHI) dos cortes de la hoja de un 1 cm de ancho por 1 cm de largo.

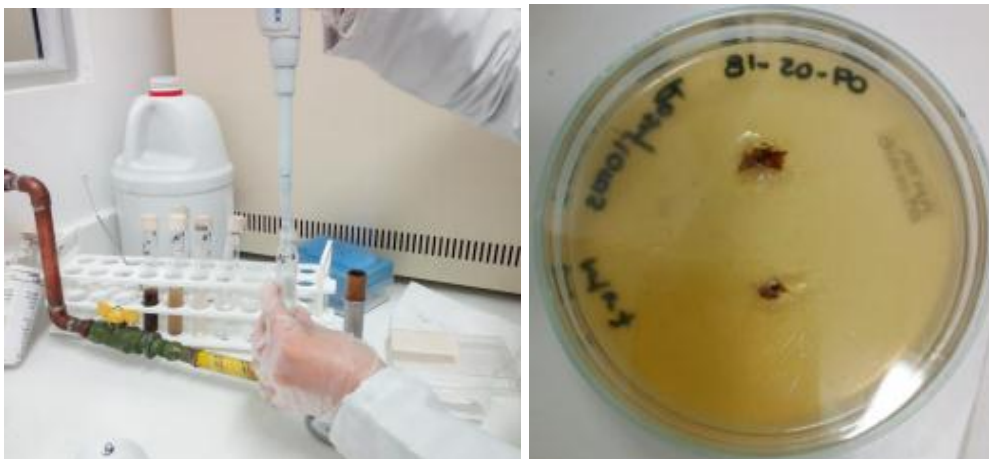


Figura 10. Preparación de diluciones seriadas de las muestras de suelo y siembra de muestras con material vegetal. Foto tomada por las autoras

5.8.1.3 Segundo Aislamiento

En esta fase, se buscó el aislamiento de colonias de interés en la investigación, compatibles con *Fusarium*, se realizó la siembra de las colonias que se confirmaron como *Fusarium* sp, macroscópicamente en Agar Sabouraud y Agar PDA, en el aislamiento inicial y microscópicamente con azul de lactofenol confirmando la presencia de conidios e hifas compatibles con *Fusarium* sp.

En el caso de las bacterias como posibles controladores biológicos, se hizo una siembra en Agar BHI de aquellos microorganismos que presentaron formas cocoides y bacilares, tanto Gram negativas como Gram positivas por medio de la tinción de Gram.

5.8.2 Segunda fase: Identificación Microbiológica de bacterias como posibles controladores biológicos.

La identificación de los biocontroladores se realizó, primero con tinción de Gram, para hacer la identificación microscópica de bacterias.

La identificación del género se realizó por medio de pruebas bioquímicas en tubo, las cuales se sembraron en fase de crecimiento. Posteriormente, se confirmaron con pruebas rápidas de identificación empleando el método sistema BBL Crystal.



Figura 11. Identificación microbiológica de biocontroladores por medio de pruebas bioquímicas en tubo. Foto tomada por las autoras

5.8.3 Tercera fase: Identificación Microbiológica y Molecular de Patógenos

5.8.3.1 Extracción de ADN de Patógenos Aislados

Inicialmente, se realizó la identificación macroscópica y microscópica de cada hongo, con el fin de seleccionar aquellos que por sus características fuesen compatibles con *Fusarium* sp. Una vez identificados por microscopía, características macroscópicas y clave dicótoma, se procedió a la identificación molecular.

La caracterización molecular se realizó en cuatro pasos:

1. Obtención de biomasa del hongo.

2. Extracción de ADN, por dos métodos directamente de los hongos aislados.
3. Amplificación de ADN por PCR.
4. Secuenciación de material identificado (Corpogen).

1. La biomasa se realizó preparando caldo para dextrosa, en el cual se sembraron los hongos que se aislaron de los medios de cultivo y se dejó en crecimiento por 8 días a 28° C.

2. El primer procedimiento de extracción de DNA se hizo utilizando 350 ml tampón de extracción: (Tris- HCl 89 mM a pH 8.0, ácido bórico 45 mM, EDTA 0.05 mM, 1,0% β -mercaptoetanol). Los tres primeros componentes del buffer se autoclavaron a 121° C por 15 minutos y posteriormente se adicionó el β -mercaptoetanol. Una vez preparado el buffer, se procedió a agregar 500 uL del buffer de extracción en un tubo Eppendorf y se le adicionó micelio. El siguiente paso fue romper el micelio con un taladro y puntas especiales para romper el micelio y para garantizar una buena biomasa de material genético.

Este procedimiento se realizó hasta tener una mezcla homogénea del buffer y micelio. Se agitó en vórtex por 1 minuto, se llevó a incubación a 75°C por 15 min, se centrifugó a 16,000 rpm por 15 min y por último el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, sin pasar sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta continuar con el siguiente paso.

El segundo método de extracción se realizó con el Kit comercial "Wizard Genomic DNA Purification Kit" de la casa comercial Promega. El micelio de los hongos en estudio se maceró en un mortero, al cual se le agregó nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo. Una vez obtenido, se pesó y se llevaron 40 mg de esta muestra a un tubo Eppendorf. Se agregaron 600 uL de Nuclei Lysis Solution y se agitó por 2 minutos; posteriormente, se incubó a 65°C por 15 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se adicionaron 3 μ l de solución de ARNasa al lisado celular y se mezcló la muestra invirtiendo el tubo 2 a 5 veces e incubando la mezcla a 37°C, durante 15 minutos. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se agregaron 200 μ l de solución de precipitación proteica y se agitó

vigorosamente a alta velocidad en vórtex durante 20 segundos, se centrifugó durante 3 minutos a 15,000 rpm.

Las proteínas precipitadas formaron un pellet, se retiró con cuidado el sobrenadante que contiene el ADN (dejando atrás el sedimento de proteínas) y se transfirió a un Eppendorf limpio el cual contenía 600 uL de isopropanol, se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN similares a hilos formaron una masa visible. Se volvió a centrifugar a 15,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente, se decantó con cuidado el sobrenadante y se agregaron 600µl de etanol al 70%, a temperatura ambiente para lavar el ADN. Se aspiró con cuidado el sobrenadante, se invirtió el tubo sobre una toalla absorbente y se dejó secar el pellet 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se agregaron 100µl de solución de rehidratación de ADN, se incubó a 65°C durante 1 hora, agitando periódicamente en vortex y se guardó entre 2° y 4 °C, hasta el siguiente procedimiento.



Figura 12. Extracción de ADN “Wizard Genomic DNA Purification Kit” con nitrógeno líquido. Figura 7A maceración del micelio. 7B Nitrógeno líquido Fotos tomadas por las autoras

5.8.3.2 Amplificación de ADN por PCR

Se utilizaron dos primers ITS (ITS1 e ITS4) específicos para la identificación del ADN micótico, de los cuales se utilizaron 0.2uL por muestra de cada uno, Taq polimerasa 2X 2.50uL por muestra, agua 9.0 uL por muestra y de la muestra 0.5 uL. Luego se llevó al termociclador, siguiendo las especificaciones que se presentan a continuación en la tabla 6.

TABLA 6. ESPECIFICACIONES CICLOS Y TEMPERATURAS PARA PCR		
CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1 ciclo	94°C	30 segundos
25 ciclos	94°C	15 segundos
	55.5°C	30 segundos
	68°C	45 segundos
1 ciclo	68°C	5 minutos
1 ciclo	10°C	Periodo indefinido

Una vez finalizó el tiempo del termociclador, se procedió a realizar la electroforesis, para la cual se utilizó TBE 0.5 X (EDTA, Tris HCl, Ácido bórico) y agarosa para realizar el gel de corrido. Se agregó 100 ml de TBE 0.5 X y 1 gramo de agarosa, se colocó en la plancha hasta que la mezcla se observará totalmente homogénea. Se dejó enfriar 5 minutos y se le agregó 10 uL de Gel Green como marcador de corrido, se dispensó en la base previamente calibrada, hasta que solidificó. Se colocaron las muestras en el gel, una vez estuviera en la cámara con el buffer TBE 0.5X cubriéndolo en su totalidad. Se colocaron los electrodos y se utilizó un voltaje 80v por 45 minutos. Se visualizaron las bandas con la replicación del ADN en estudio, por medio de luz ultravioleta y el equipo “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD (Figura 7).

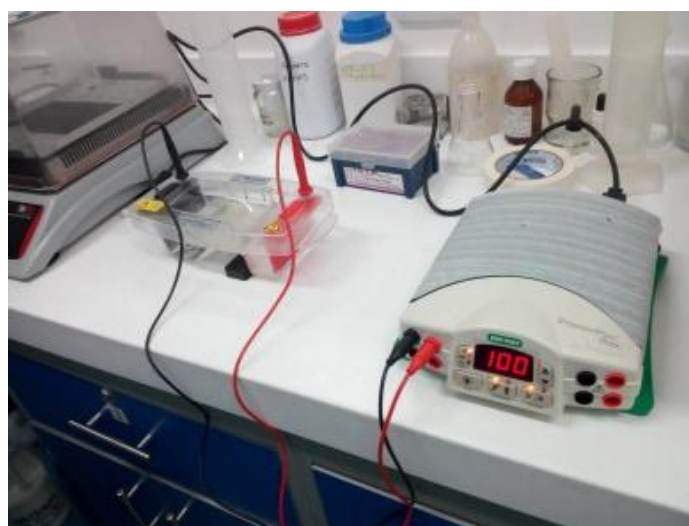


Figura 13. Electroforesis. Foto tomada por las autoras

5.8.3.3. Secuenciación del material amplificado

El material que fue amplificado de cada una de las muestras, se envió en viales Eppendorf a Corpogen donde realizaron la secuenciación del ADN. Anexo 1.

5.8.4 Cuarta Fase: Pruebas In Vitro

5.8.4.1 Pruebas *in vitro* para Determinar Antagonismo

Se utilizó el antagonismo por enfrentamiento dual como método de observación del comportamiento de un patógeno frente a dos posibles biocontroladores. Se utilizó como control positivo a *Fusarium oxysporum* y como biocontrolador a *Bacillus subtilis* (Cepa caracterizada como biocontrolador e identificada por técnicas moleculares por el grupo CEPARIUM). Se utilizaron los hongos aislados de las muestras obtenidas de suelo, como patógenos y bacterias nativas aisladas de las muestras de suelo y tejido vegetal de los cultivos de Gulupa y Maracuyá de las cuatro fincas del municipio de Pasca, Cundinamarca, que se utilizaran como posibles controladores biológicos. Este procedimiento se realizó por triplicado en tres medios de cultivo (Agar Sabouraud, PDA y Agar BHI), para observar la actividad antagónica en cada uno de los agares. Todos los medios se dejaron incubando 8 días a 28 °C, con el fin de favorecer el crecimiento de los hongos. Las observaciones se hicieron a partir del quinto día.

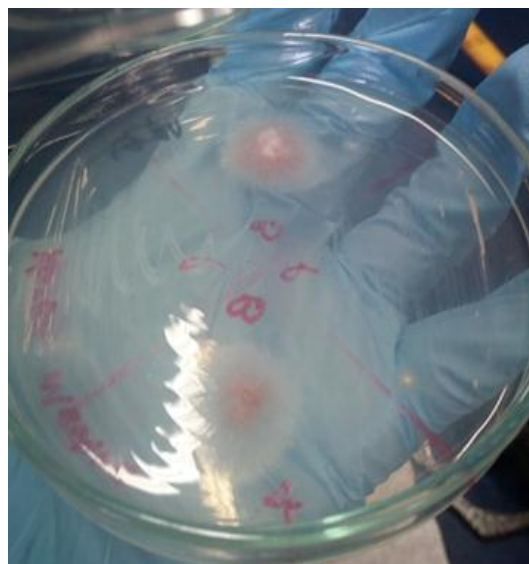

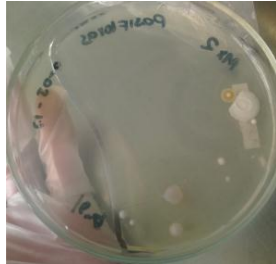










Figura 14. Enfrentamiento dual entre patógeno y dos biocontrolador. Control positivo. Foto tomada por autoras




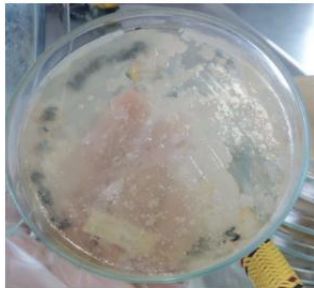


6. RESULTADOS




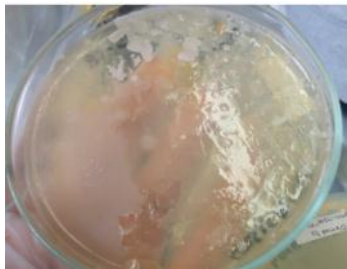


6.1 Primera fase

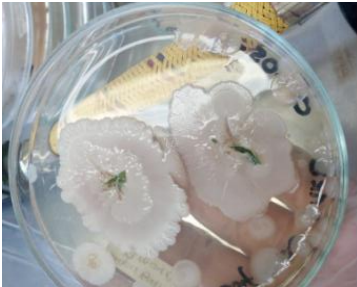



Se obtuvo una gran variedad de microorganismos. Se seleccionaron los hongos que tuvieran morfología compatible con *Fusarium spp.* No se procesaron los hongos diferentes a *Fusarium*. En el caso de los posibles controladores biológicos, se escogieron aquellas colonias que macroscópicamente tuviesen características bacterianas. (Tabla 7).

TABLA 7. PRIMERA SIEMBRA DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS DE SUELO Y MATERIAL VEGETAL			
Medios de cultivo	Descripción	Medios de cultivo	Descripción
<p>Agar Sabouraud Dilución 10⁻⁴ (Muestra 1)</p>	 <p>Figura 15 No hubo crecimiento</p>	<p>Agar Sabouraud Dilución 10⁻⁴ (Muestra 2)</p>	 <p>Figura 16 -Colonias blancas, planas, cremosas, puntiformes. -Colonias plana, redonda, color blanco en el centro y amarillo en las orillas -Colonia blanca, elevada y de forma irregular</p>
<p>Agar Sabouraud Dilución 10⁻² (Muestra 1)</p>	 <p>Figura 17 -Colonia algodonosa grande - Colonias irregulares color crema, plana</p>	<p>Agar PDA Dilución 10⁻¹ (Muestra 2)</p>	 <p>Figura 18 -Colonia blanca, algodonosa, elevadas, forma irregular</p>

	-Colinas blan.cas irregulares cremosas, elevada		-Colonias blancas, planas, redondas.
Agar BHI Dilución 10⁻³ (Muestra 1)	 Figura 19 -Colonias blanca, grande irregular y plana -Colonias cremosas medianas de color amarillo en el centro y blanco en las orillas	Agar PDA Dilución 10⁻² (Muestra 2)	 Figura 20 -Colonias blancas algodonosa, elevadas, grandes e irregulares -Colonias color crema, redondas, cremosas, pequeñas y planas.
Agar PDA Dilución 10⁻¹ (Muestra 1)	 Figura 21 -Colonia algodonosa grande redonda de color blanco y elevada -Colonia plana de color verde oliva algodonosa -Colonias irregulares blancas algodonosas convexas -Colonias planas irregulares color crema y blanco	Agar PDA Dilución 10⁻³ (Muestra 2)	 Figura 22 -Colonias blancas, planas, redondas, cremosas. -Colonia blanca, algodonosa, pequeña. Colonia cremosas, planas, color crema e irregulares
Agar PDA Dilución 10⁻³ (Muestra 1)	 Figura 23 - Colonias planas, blancas, en forma de rizoides	Agar Sabouraud Dilución 10⁻² (Muestra 2)	 Figura 24 -Colonias planas, color

	-Colonia blanca, elevada, redonda y algodonosa		crema y forma irregular -Colonias blancas, planas de forma irregular y membranosa
Agar Sabouraud Dilución 10⁻² (Muestra 3)	 Figura 25 - Colonias blancas algodonosas elevadas redondas -Colonias blancas planas algodonosas irregulares	Agar Sabouraud Dilución 10⁻² (Muestra 4)	 Figura 26 -Colonias color crema, planas, cremosas e irregulares. -Colonias blancas, algodonosas, elevadas -Colonias amarillas, planas, cremosas e irregulares.
Agar BHI Dilución 10⁻² (Muestra 3)	 Figura 27 - Colonias planas irregulares de color café -Colonias planas irregulares de color amarillo -Colonias planas irregulares de color blanco.	Agar BHI Dilución 10⁻² (Muestra 4)	 Figura 28 -Colonias, color crema, planas, irregulares y cremosas. -Colonias blancas, puntiformes, planas.
Agar BHI Dilución 10⁻³ (Muestra 3)	 Figura 29 - Colonias planas irregulares de color café. -Colonias planas irregulares de color blanca cremosa	Agar PDA Dilución 10⁻¹ (Muestra 4)	 Figura 30 -Colonias blancas, elevadas algodonosas e irregulares. -Anverso: Colonia blanca,

	-Colonias planas irregulares de color blanco algodonosas		algodonosa, elevada e irregular. Reverso: pigmentación verdosa. -Colonias amarillo-naranja, pequeñas, puntiformes y planas.
Agar PDA Dilución 10⁻¹ (Muestra 5)	 Figura 31 -Colonias planas irregulares de color blanco algodonosas -Colonias blancas algodonosas elevadas redondas	Agar PDA Dilución 10⁻³ (Muestra 5)	 Figura 32 -Colonias blancas, elevadas, algodonosa. - Anverso: Colonia blanca, algodonosa, elevada e irregular. Reverso: pigmentación verdosa. -Colonias amarillo-naranja, pequeñas, puntiformes y planas.
Agar PDA Dilución 10⁻³ (Muestra 6)	 Figura 33 -Colonias blancas algodonosas elevadas redondas	Agar BHI Dilución 10⁻³ (Muestra 6)	 Figura 34 Crecimiento de colonias color crema, planas, cremosas e irregulares
Agar Sabouraud (Muestra 7)		Agar BHI (Muestra 7)	

	<p>Figura 35 -Colonias algodonosas, blancas, elevadas, de forma irregular. -Colonias color crema, planas, cremosas e irregulares. Reverso: Pigmentación amarilla.</p>		<p>Figura 36 Crecimiento de colonias color crema, planas, cremosas e irregulares. Reverso: Pigmentación amarilla</p>
<p>Agar BHI (Muestra 8)</p>	 <p>Figura 37 Crecimiento de colonias blancas, opacas y de forma irregular.</p>	<p>Agar Sabouraud (Muestra 8)</p>	 <p>Figura 38 -Colonias algodonosas, blancas, grandes, elevadas. -Colonia blanca, puntiforme, Cremosa y plana. -Colonia blanca, opaca, Plana e irregular.</p>
<p>Agar BHI (Muestra 9)</p>	 <p>Figura 39 Crecimiento de colonias blancas, lisas, planas y cremosas.</p>	<p>Agar PDA (Muestra 9)</p>	 <p>Figura 40 -Colonias blancas, lisas, planas y cremosas. -Colonias blancas, elevadas, algodonosas e irregulares.</p>

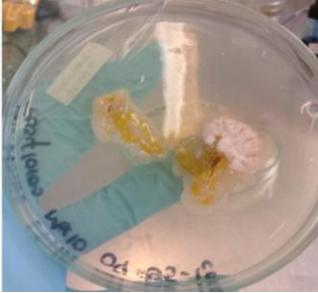

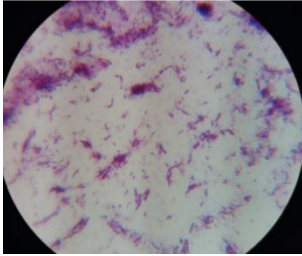
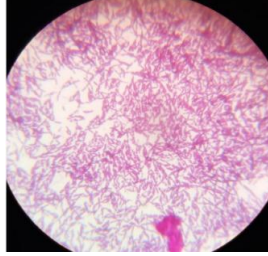
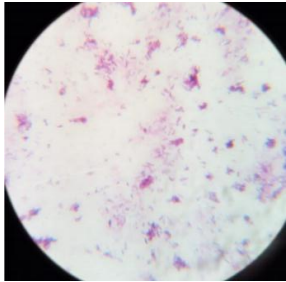

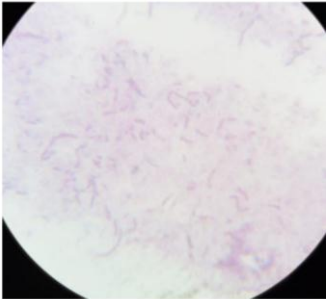
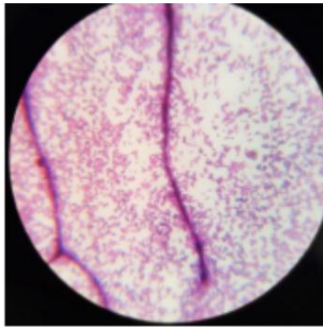
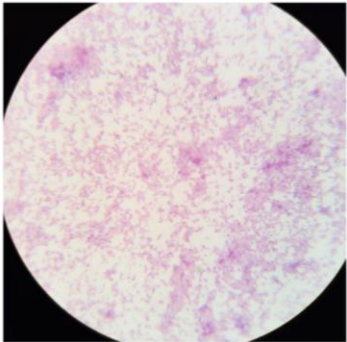
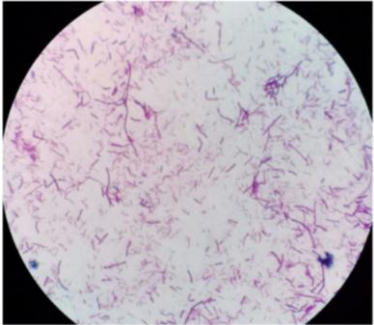
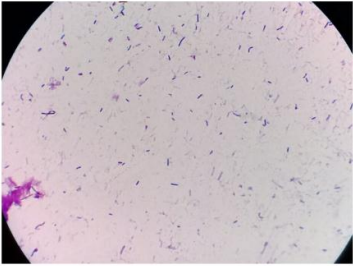
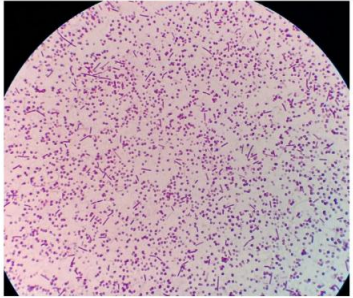
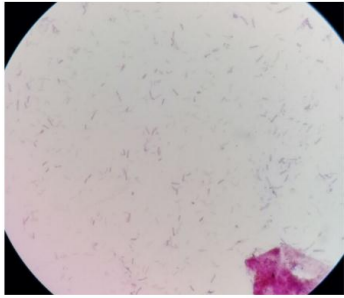
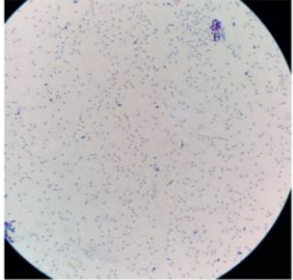
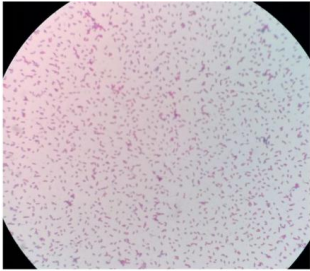
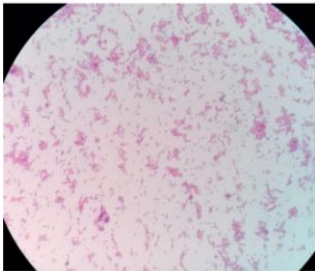
<p>Agar Sabouraud (Muestra 10)</p>	 <p>Figura 41 Crecimiento de colonias cremosas, lisas, planas con pigmentación amarilla en el centro y blanca en los bordes.</p>	<p>Agar BHI (Muestra 10)</p>	 <p>Figura 42 Crecimiento de colonias blancas, opacas, planas e Irregulares.</p>
---	--	---	--

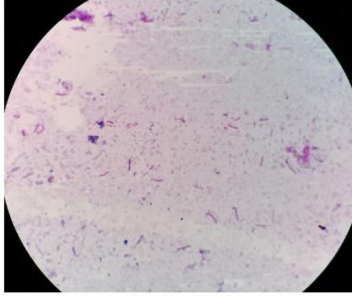
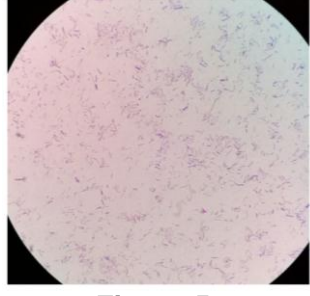
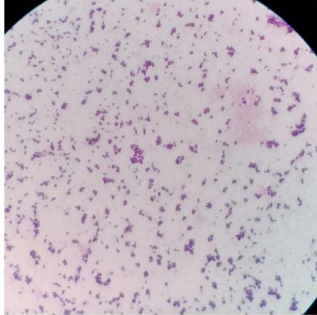
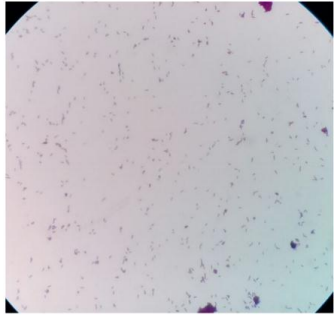
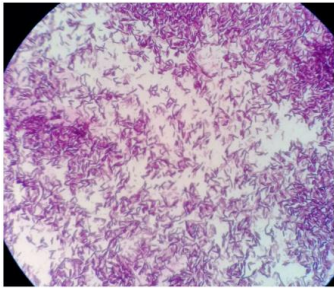
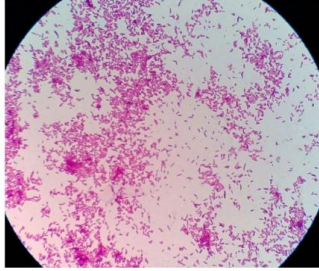
Tabla 7. Primera siembra de microorganismos encontrados en las muestras de suelo y material vegetal. Fotos tomadas y agrupadas por las autoras

A continuación, se presentan las observaciones microscópicas de las bacterias (Figuras 38-58) y hongos miceliales aislados (Figuras 59- 72):

TABLA 8. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA POR MEDIO DE LA TINCIÓN DE GRAM DE LOS MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS EN ESTUDIO			
Medios de cultivo	Descripción	Medios de cultivo	Descripción
<p>Agar BHI Dilución 10⁻² (Muestra1)</p>	 <p>Figura 43 Bacilos Gram negativos medianos</p>	<p>Agar BHI Dilución 10⁻³ (Muestra 1)</p>	 <p>Figura 44 Bacilos Gram negativos Grandes</p>

<p>Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Muestra 1)</p>	 <p>Figura 45 Bacilos Gram negativos medianos</p>	<p>Agar PDA Dilución 10^{-3} (Muestra 1)</p>	 <p>Figura 46 Bacilos Gram positivos Grandes</p>
<p>Agar BHI Dilución 10^{-2} (Muestra 2)</p>	 <p>Figura 47 Bacilos Gram positivos grandes</p>	<p>Agar PDA Dilución 10^{-3} (Muestra 2)</p>	 <p>Figura 48 Cocos y bacilos Gram Negativos</p>
<p>Agar Sabouraud Dilución 10^{-4} (Muestra 3)</p>	 <p>Figura 49 Bacilos Gram negativos pequeños</p>	<p>Agar BHI Dilución 10^{-2} (Muestra 4)</p>	 <p>Figura 50 Bacilos Gram positivos Grandes</p>

<p>Agar BHI Dilución 10^{-3} (Muestra 4)</p>	 <p>Figura 51 Bacilos Gram negativos medianos</p>	<p>Agar BHI Dilución 10^{-3} (Punto 1) (Muestra 4)</p>	 <p>Figura 52 Cocos y bacilos Gram negativos</p>
<p>Agar BHI Dilución 10^{-1} (Muestra 5)</p>	 <p>Figura 53 Bacilos Gram positivos Medianos</p>	<p>Agar BHI Dilución 10^{-2} (Muestra 5)</p>	 <p>Figura 54 Bacilos Gram positivos Pequeños</p>
<p>Agar Sabouraud Dilución 10^{-4} (Muestra 5)</p>	 <p>Figura 55 Bacilos Gram negativos pequeños</p>	<p>Agar Sabouraud Dilución 10^{-2} (Muestra 5)</p>	 <p>Figura 56 Bacilos Gram negativos Pequeños</p>

<p>Agar BHI Dilución 10^{-2} (Muestra 6)</p>	 <p>Figura 57 Bacilos Gram positivos medianos</p>	<p>Agar BHI Dilución 10^{-3} (Muestra 6)</p>	 <p>Figura 58 Bacilos Gram positivos Medianos</p>
<p>Agar BHI (Muestra 7)</p>	 <p>Figura 59 Cocos Gram positivos</p>	<p>Agar BHI (Muestra 7)</p>	 <p>Figura 60 Bacilos Gram positivos Pequeños</p>
<p>Agar BHI (Muestra 8)</p>	 <p>Figura 61 Bacilos Gram positivos grandes</p>	<p>Agar BHI (Muestra 9)</p>	 <p>Figura 62 Bacilos Gram negativos pequeños</p>

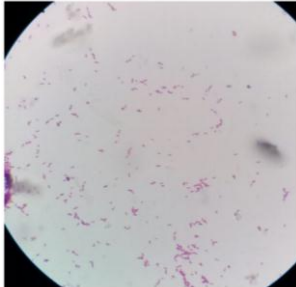

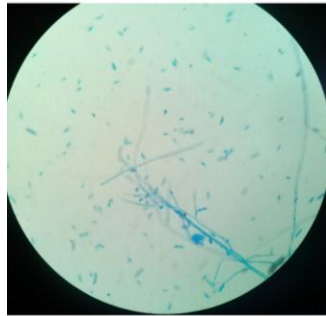
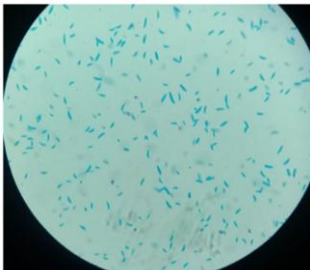

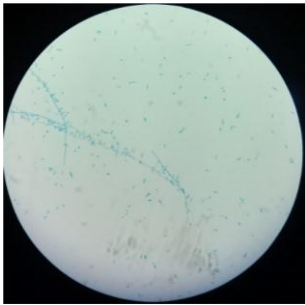
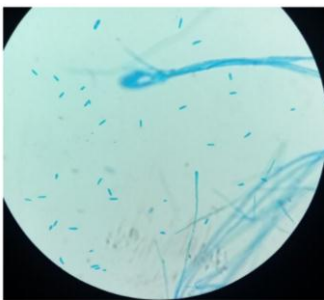
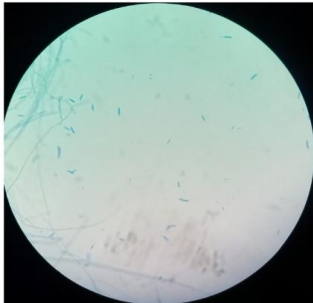
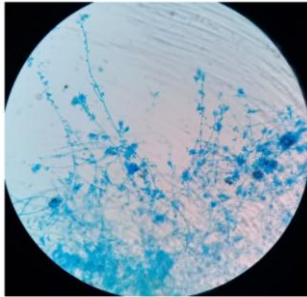
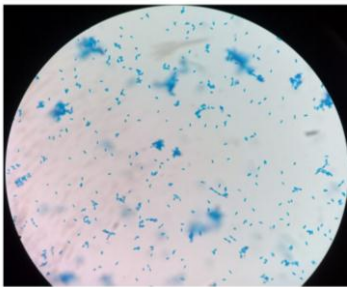
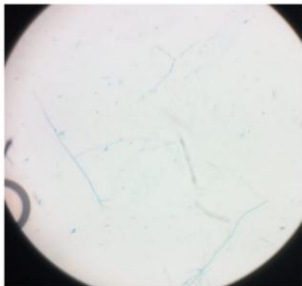
<p>Agar BHI (Muestra 10)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Figura 63 Bacilos Gram negativos pequeños</p> </div>
---	---

Tabla 8. Identificación Morfológica Por Medio De La Tinción De Gram De Los Microorganismos Encontrados En Las Muestras En Estudio. Fotos tomas y agrupadas por las autoras.

TABLA 9. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA POR MEDIO DE LA TINCIÓN DE AZUL DE LACTOFENOL A LOS MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS EN ESTUDIO			
Medios de cultivo	Descripción	Medios de cultivo	Descripción
<p>Agar PDA Dilución 10⁻¹ (Muestra 1)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Figura 64 Hifas hialinas, conidióforo, fiálides largas y conidios compatibles con <i>Aspergillus</i> spp.</p> </div>	<p>Agar PDA Dilución 10⁻¹ (Muestra 1)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Figura 65 Hifas hialinas septadas, fiálides y microconidias elipsoidales, ovaladas compatibles con <i>Fusarium</i> spp.</p> </div>
<p>Agar PDA Dilución 10⁻¹ (Muestra 1)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Figura 66</p> </div>	<p>Agar Sabouraud Dilución 10⁻³ (Muestra 2)</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Figura 67</p> </div>

	Microconidias elipsoidales, ovaladas y en forma de clava compatible con <i>Fusarium</i> spp.		Hifas hialinas septadas, microconidias
Agar PDA Dilución 10 ⁻³ (Muestra 3)	 <p>Figura 68 Hifa hialina delgada, abundantes microconidias septadas, compatibles con <i>Fusarium</i> spp.</p>	Agar PDA Dilución 10 ⁻⁴ (Muestra 3)	 <p>Figura 69 Hifas hialinas septadas, microconidias ovaladas y elipsoidales. compatibles con <i>Fusarium</i> spp</p>
Agar sabouraud Dilución 10 ⁻² (Muestra 3)	 <p>Figura 70 Hifas hialinas delgadas con microconidias ovaladas y elipsoidales.</p>	Agar PDA Dilución 10 ⁻¹ (Muestra 4)	 <p>Figura 71 Hifas hialinas, conidióforo ramificado, fiálides múltiples, delgadas y largas, conidios en cadena. Compatibles con <i>Paecilomyces</i> spp.</p>
Agar PDA Dilución 10 ⁻³ (Muestra 5)	 <p>Figura. 72 Abundantes microconidias ovaladas</p>	Agar Sabouraud Dilución 10 ⁻² (Muestra 6)	 <p>Figura 73 Hifas septadas y microconidias compatibles</p>

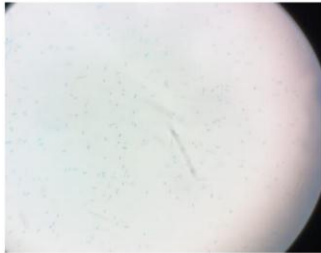

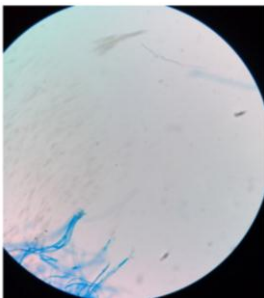
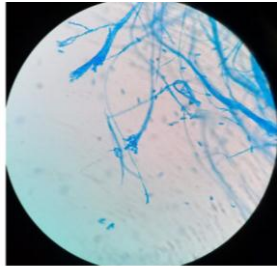
<p>Agar PDA Dilución 10¹ (Muestra 6)</p>	 <p>Figura 74 Microconidias compatibles con <i>Fusarium</i> spp</p>	<p>Agar PDA Dilución 10⁻³ (Muestra 6)</p>	 <p>Figura 75 Hifas hialinas y esporangio redondo compatible con <i>Mucor</i> spp</p>
<p>Agar BHI (Muestra 8)</p>	 <p>Figura 76 Hifas hialinas septadas</p>	<p>Agar Sabouraud (Muestra 10)</p>	 <p>Figura 77 Hifas hialinas <i>Paecilomyces</i> spp.</p>

Tabla 9. Identificación morfológica por medio de la tinción de azul de lactofenol a los microorganismos posiblemente patógenos encontrados en las muestras en estudio. Fotos tomadas y recopiladas por las autoras.

La identificación microscópica de los hongos y la búsqueda por claves dicótomas, arrojó los siguientes hallazgos: *Paecilomyces* spp, *Mucor* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp y algunos que no pudieron ser identificados. No se encontraron formas micóticas levaduriformes.

En cuanto a bacterias, se encontraron Gram positivas como Gram negativas, de forma bacilar y cocoide.

Todos los hongos que presentaron hifas hialinas septadas, con presencia de macroconidias en forma de media luna o plátanos; o presencia de microconidias ovaladas septadas hialinas, fueron seleccionados para el estudio.

En cuanto, a las bacterias, se seleccionaron las bacterias que la literatura reporta con mejor capacidad antagónica.

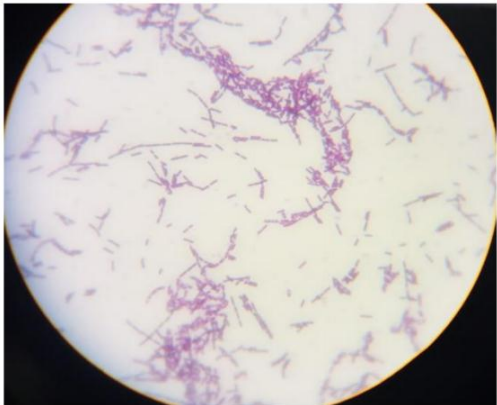
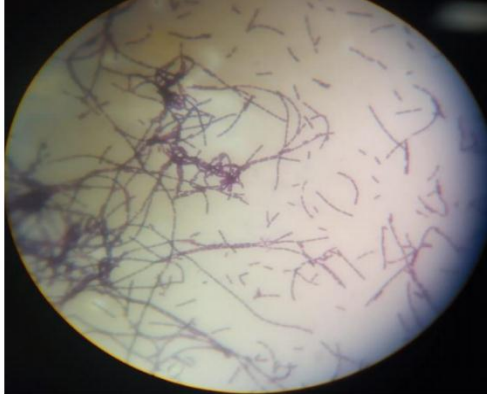

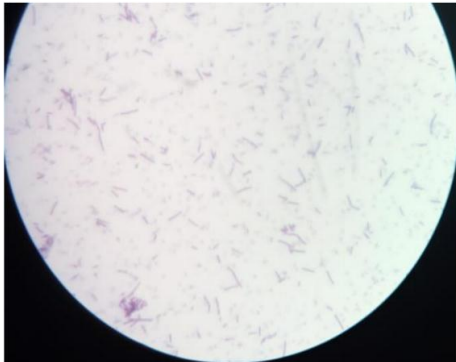
Una segunda siembra de los hongos aislados arrojó como resultados, 12 hongos del género *Fusarium* spp. y 12 bacterias, de las cuales, diez eran bacilos Gram positivos, 1 Coco Gram positivo y 1 Bacilo Gram negativo.

Los códigos asignados para cada microorganismo, se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. AISLAMIENTO FINAL DE PATÓGENOS Y POSIBLES CONTROLADORES BIOLÓGICOS			
CÓDIGO	PATÓGENOS	CÓDIGO	BIOCONTROLADORES
F1A	Muestra 1, PDA 10 ⁻¹	PB01	Muestra 1, BHI 10 ⁻²
F1B	Muestra 1, PDA 10 ⁻¹	PB02	Muestra 1, BHI 10 ⁻³
F2A	Muestra 1, PDA 10 ⁻¹	PB03	Muestra 1, PDA 10 ⁻³ (P2)
F2B	Muestra 3, Sabouraud 10 ⁻⁴	PB04	Muestra 1, PDA 10 ⁻³ (P1)
F3	Muestra 3, Sabouraud 10 ⁻²	PB05	Muestra 2, PDA 10 ⁻³
F4	Muestra 3, Sabouraud 10 ⁻²	PB06	Muestra 2, BHI 10 ⁻²
F5A	Muestra 3, Sabouraud 10 ⁻²	PB07	Muestra 4, BHI 10 ⁻²
F5B	Muestra 1, PDA 10 ⁻¹	PB08	Muestra 4, BHI 10 ⁻³
F6	Muestra 1, PDA 10 ⁻²	PB09	Muestra 8, BHI (P1)
F9	Muestra 1, PDA	PB10	Muestra 8, BHI (P2)
F12	Muestra 3, Sabouraud 10 ⁻³	PB11	Muestra 7, BHI
F13	Muestra 3, Sabouraud 10 ⁻²	PB12	Muestra 5, BHI 10 ⁻²
F14	Muestra 4, PDA 10 ⁻¹	PB13	Muestra 6, BHI 10 ⁻²

6.2 Segunda Fase: Identificación de biocontroladores por microbiología convencional

Las 12 bacterias seleccionadas como posibles biocontroladores fueron sembradas de nuevo en agar BHI para garantizar su aislamiento y purificación y se verificó de nuevo su morfología por la tinción de Gram, así:

TABLA 11. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA POR TINCIÓN DE GRAM DE BACTERIAS AISLADAS	
<p style="text-align: center;">PB01</p>  <p style="text-align: center;">Figura 78 Bacilos largos Gram positivos</p>	<p style="text-align: center;">PB 02</p>  <p style="text-align: center;">Figura 79 Bacilos largos Gram positivos</p>
<p style="text-align: center;">PB03</p>  <p style="text-align: center;">Figura 80 Bacilos largos Gram positivos</p>	<p style="text-align: center;">PB04</p>  <p style="text-align: center;">Figura 81 Bacilos pequeños Gram positivos</p>
PB05	PB06

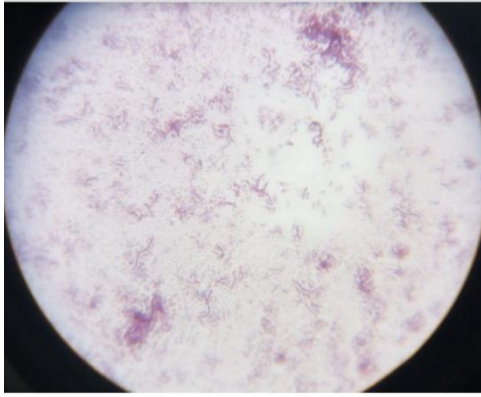


Figura 82
Bacilos medianos Gram positivos

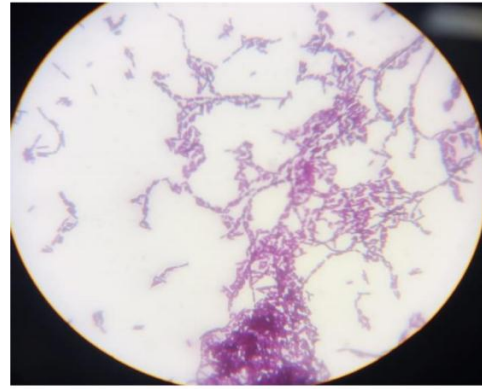


Figura 83
Bacilos largos Gram positivos

PB07

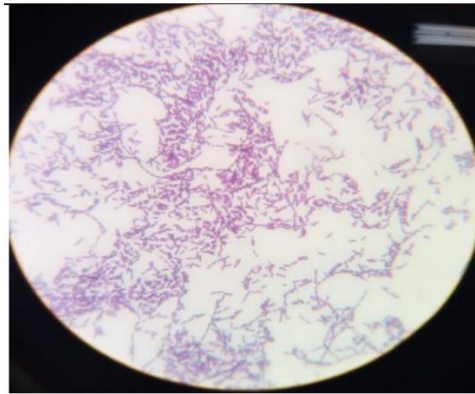


Figura 84
Bacilos medianos Gram positivos

PB08

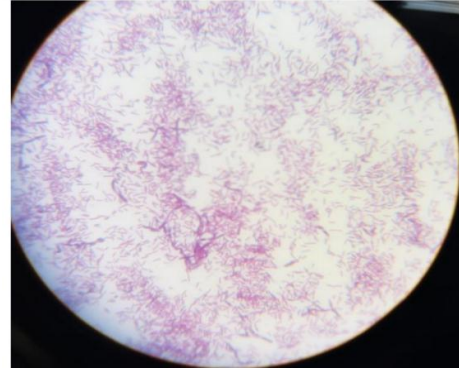


Figura 85
Bacilos medianos Gram negativos

PB09

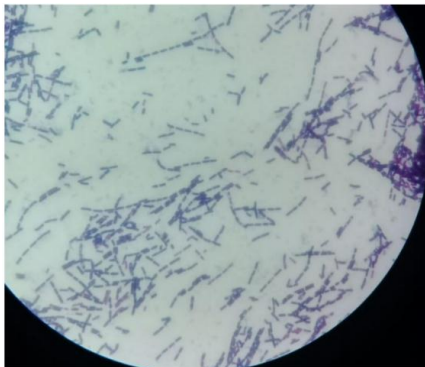


Figura 86
Bacilos largos Gram positivos

PB10

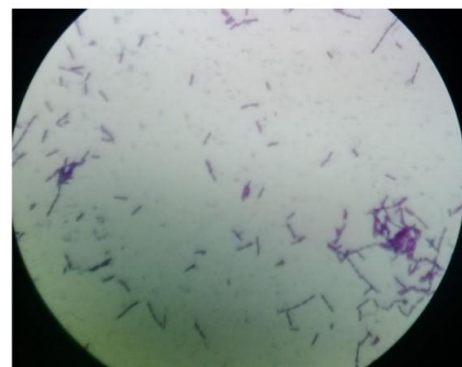
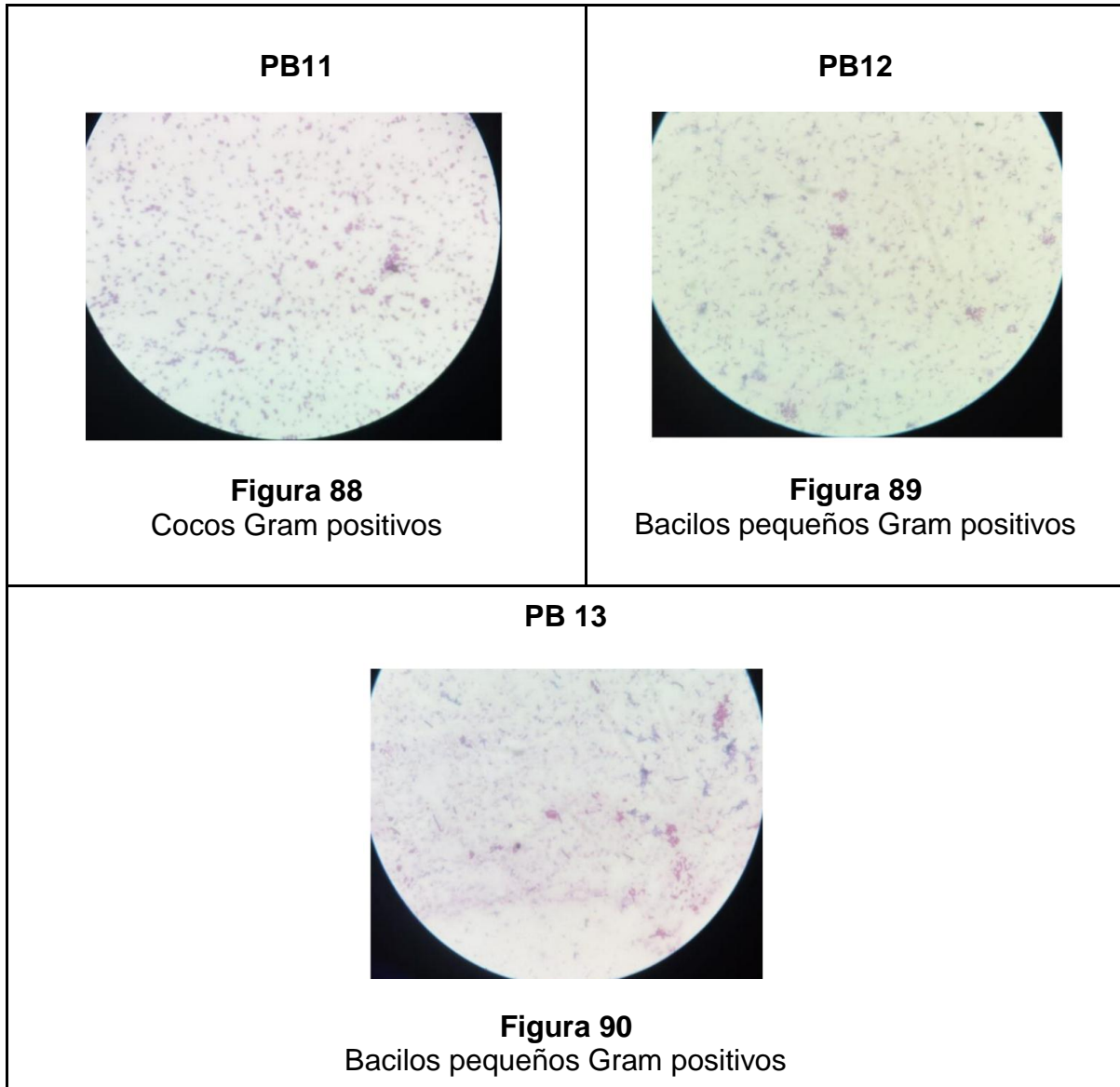


Figura 87
Bacilos medianos Gram positivos



Una vez aisladas las bacterias, se hizo la identificación del género. Los resultados que se presentan en la tabla 12, muestran la identificación arrojada por las pruebas bioquímicas en tubo.

TABLA 12. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA													
	PB 01	PB 02	PB 03	PB 04	PB 05	PB 06	PB 07	PB 08	PB 09	PB 10	PB 11	PB 12	PB 13
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI			A/A	A/A	A/A	K/K	A/A	K/A	K/A	K/A	A/A	A/A	A/A
Maltosa	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+		

Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinosa			-	-	-	-	+		+	+	+		
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+		+	+	-		
Manitol	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+		
Urea	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Nitritos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Simons Citrato	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Gelatina	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		
Bilis es.	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	+

De acuerdo con las claves dicótomas para identificación de microorganismos del libro “*Systematic bacteriology, second edition de Bergey’s*” se encontraron, bacterias Gram positivas del género *Bacillus*, especies *B. drentensis*, *B. decolorationis*, *B. assahii*, *B. joetgali*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*. La bacteria PB11, fue un coco Gram positivo que de acuerdo con estas claves se identificó del género *Staphylococcus* sp. La bacteria PB08, un bacilo Gram negativo, se identificó como *Pseudomonas* sp.

Los resultados de las pruebas rápidas BBL Crystal, se observan en la tabla 13.

TABLA 13. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS POR PRUEBAS RÁPIDAS BBL CRYSTAL	
BACTERIA	RESULTADO
PB01	No se logró identificar con este método
PB02	<i>Bacillus assahii</i>
PB03	<i>Bacillus licheniformis</i>
PB04	<i>Bacillus subtilis</i>

PB05	<i>Bacillus subtilis</i>
PB06	<i>Bacillus joeotgali</i>
PB07	<i>Bacillus licheniformis</i>
PB08	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PB09	No se logró identificar con este método
PB10	<i>Bacillus licheniformis</i>
PB11	<i>Staphylococcus warneri</i>
PB12	<i>Paenibacillus alvei</i>
PB13	No se logró identificar con este método

6.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL PATÓGENO

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la electroforesis de los hongos, en donde se observan las bandas entre 500 a 1000 pb. Figura 86.

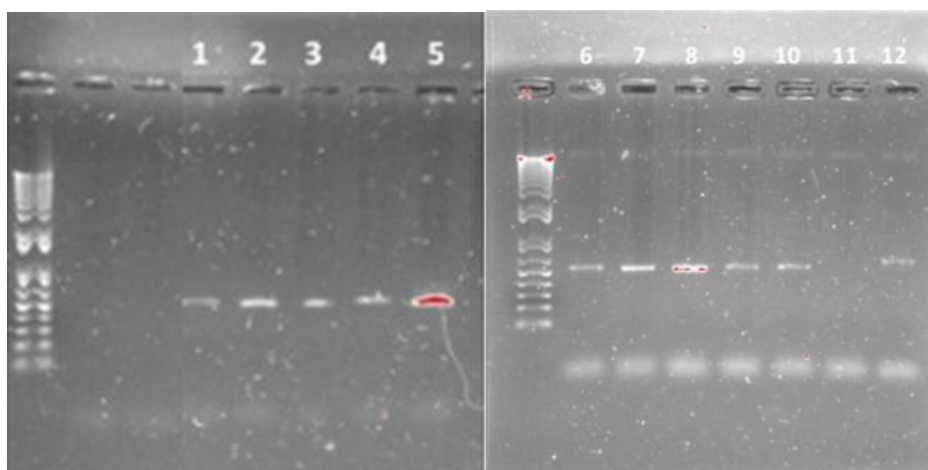


Figura 91. Imagen de “Molecular imager Gel Doc XR” de marca BIO-RAD, al finalizar la electroforesis. El primer pozo tiene el peso molecular de 1000 pb, el pozo 2 y 3 control negativo, del pozo 3 en adelante se encuentran las muestras en la tabla 6. Foto tomada por las autoras

6.4 SECUENCIACIÓN

Al obtener los productos de amplificación de PCR de las muestras, fueron enviadas a Corpogen. Posteriormente, se utilizó el programa Chromas para modificar las

secuencias de ruido. Además, la base de datos NCBI BLAST, para realizar la comparación e identificar los microorganismos. Tabla 14.

TABLA 14 RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN REALIZADA CON LA BASE DE DATOS BLAST DE LOS 13 PATÓGENOS AISLADOS							
No	HONGO PRESUNTIVO	HONGO CONFIRMADO BLAST	LONGITUD	MAX SCORE	COBERTURA	IDENTIDAD	ACCESO AL GEN BANK
1	F1A	No se identificó	-	-	-	-	-
2	F1B	No se identificó	-	-	-	-	-
3	F2A	<i>Fusarium solani</i>	300	377	91%	89.97%	MH855637.1
4	F2B	<i>Fusarium solani</i>	300	381	91%	89.97%	HQ379685.1
5	F3	No se identificó	-	-	-	-	-
6	F4	No se identificó	-	-	-	-	-
7	F5A	<i>Fusarium oxysporum</i>	980	885	50%	98.80%	MF688883.1
8	F5B	<i>Fusarium oxysporum</i>	326	363	89%	93.5%	MH578603.1
9	F6	<i>Phoma sp</i>	400	473	99%	88.53%	KT581922.1
10	F9	<i>Epicoccum cf. nigrum</i>	400	595	100%	100%	MH782554.1
11	F12	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	600	931	32%	99.4%	KY587331.1
12	F13	<i>Fusarium oxysporum</i>	500	894	100%	98.9%	KY786127.1

Se logró identificar con género y especie los 8 patógenos aislados de las cuatro fincas de Pasca, Cundinamarca, en los cuales se encontró en 4 muestras la presencia de *Fusarium oxysporum*, dos como *Fusarium solani*, un *Epicoccum nigrum* y un *Phoma sp*

6.5 ANTAGONISMO *In vitro*

Las pruebas *in vitro* realizadas con los microorganismos seleccionados e identificados por microbiología convencional, dieron los siguientes resultados:

TABLA 15. PRUEBAS DE ANTAGONISMO

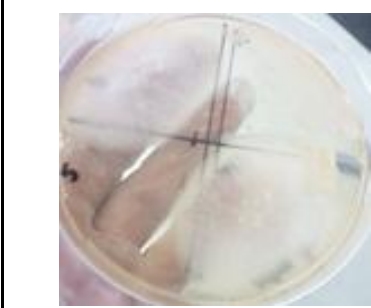


Figura 92. Antagonismo 1 en medio PDA. Patógeno:F2B biocontroladores PB01 y PB02.

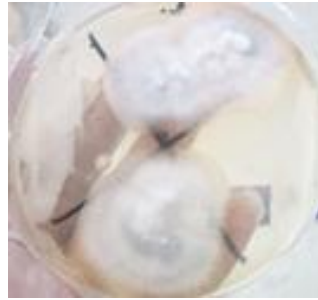


Figura 93. Antagonismo 1 en medio Sabouraud, Patógeno F2B y biocontroladores PB01 y PB02.



Figura 94. Antagonismo 1 en medio BHI, Patógeno F2B biocontroladores PB01 PB02.

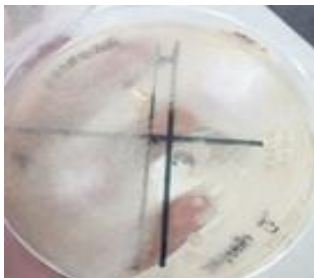


Figura 95. Antagonismo 2 en medio PDA, patógeno la F1A,biocontroladores PB03 y PB04.



Figura 96. Antagonismo 2 en medio Sabouraud, patógeno F1A, biocontroladores PB03 PB04.



Figura 97. Antagonismo 2 en medio BHI, patógeno F1A, biocontroladores PB03 PB04.



Figura 98. Antagonismo 3 en medio PDA, patógeno F14, biocontroladores PB05 PB06.



Figura 99. Antagonismo 3 en medio Sabouraud, patógeno F14,biocontroladores PB05 PB06.



Figura 100. Antagonismo 3 en medio BHI, patógeno la F14, biocontroladores PB05 PB06.

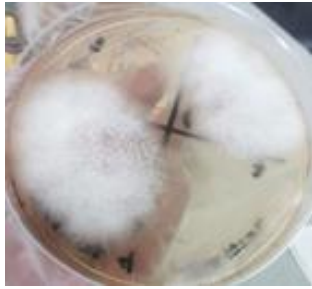


Figura 101. Antagonismo 4 en medio PDA, patógeno F3 biocontroladores PB07 PB08.



Figura 102. Antagonismo 4 en medio Sabouraud, patógeno F3 biocontroladores PB07 PB08.



Figura 103. Antagonismo 4 en medio BHI, Patógeno F3 biocontroladores PB07 y PB08.



Figura 104. Antagonismo 5 en medio PDA, patógeno F4 biocontroladores PB09 PB10.



Figura 105. Antagonismo 5 en medio Sabouraud, patógeno F4 biocontroladores PB09 PB10.



Figura 106. Antagonismo 5 en medio BHI, patógeno F4 biocontroladores PB09 PB10.

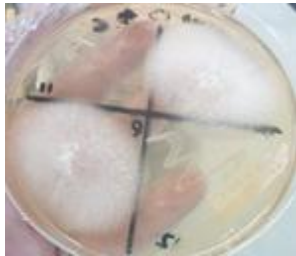


Figura 107. Antagonismo 6 en medio PDA, patógeno F5A, biocontroladores PB11 PB12.

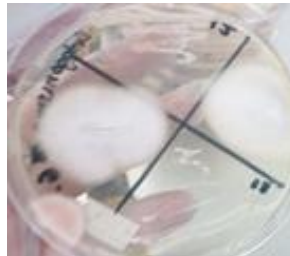


Figura 108. Antagonismo 6 en medio Sabouraud, patógeno F5A, biocontroladores PB11 PB12.



Figura 109. Antagonismo 6 en medio BHI, Patógeno F5A, biocontroladores PB11 PB12.

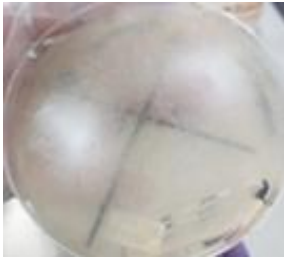


Figura 110. Antagonismo 7 en medio PDA, patógeno F1B, biocontroladores PB13 PB06.



Figura 111. Antagonismo 7 en medio Sabouraud, patógeno F1B, biocontroladores PB13 y PB06.



Figura 112. Antagonismo 7 en medio BHI, patógeno F1B, biocontroladores PB13 PB06.



Figura 113. Antagonismo 8 en medio PDA, patógeno F2A biocontroladores PB02 PB09.



Figura 114. Antagonismo 8 en medio Sabouraud, patógeno F2A biocontroladores PB02 PB09.



Figura 115. Antagonismo 8 en medio BHI, patógeno F2A biocontroladores PB02 PB09.




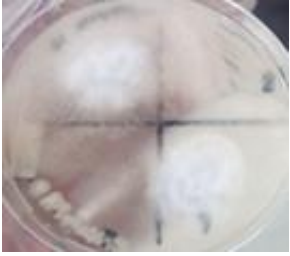

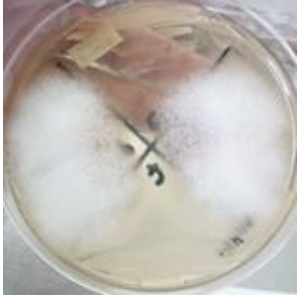


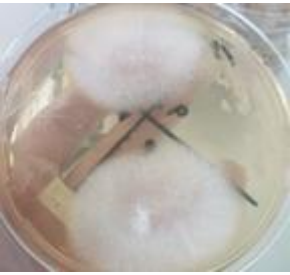


Figura 116. Antagonismo 9 en medio PDA, Patógeno F5B biocontroladores PB01 y PB12.



Figura 117. Antagonismo 9 en medio Sabouraud, patógeno F5B biocontroladores PB01 PB12.



Figura 118. Antagonismo 9 en medio BHI, patógeno F5B biocontroladores PB01 PB12.

 <p>Figura 119. Antagonismo 10 en medio PDA, Patógeno F9, y como biocontroladores la muestra PB05 y PB08</p>	 <p>Figura 120. Antagonismo 10 en medio Sabouraud, patógeno la muestra F9, biocontroladores PB05 PB08</p>	 <p>Figura 121. Antagonismo 10 en medio BHI, Patógeno F9, biocontroladores PB05 PB08</p>
 <p>Figura 122. Antagonismo 11 en medio PDA, Patógeno F12 Biocontroladores PB07 PB10</p>	 <p>Figura 123. Antagonismo 11 en medio Sabouraud, Patógeno F12 Biocontroladores PB07 PB10.</p>	 <p>Figura 124. Antagonismo 11 en medio BHI, patógeno F12 biocontroladores PB07 PB10.</p>
 <p>Figura 125. Antagonismo 12 en medio PDA, Patógeno F13, biocontroladores PB11 PB09.</p>	 <p>Figura 126. Antagonismo 12 en medio BHI, patógeno F13, biocontroladores PB11 PB09.</p>	 <p>Figura 127. Antagonismo 12 en medio BHI, patógeno F13, biocontroladores PB11 PB09.</p>

En la siguiente tabla se presenta el crecimiento en cm del hongo frente a cada bacteria posible biocontroladora: Ver tabla 13.

TABLA 13. DIÁMETRO DE CRECIMIENTO DE LOS PATÓGENOS FRENTE A CADA BIOCONTROLADOR

Antagonismo	Medio de cultivo	Diámetro crecimiento de los Patógenos	Posibles Biocontroladores
Control positivo	PDA	<i>Fusarium oxysporum:</i> 3.0 cm 3.0 cm	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
	Sabouraud	<i>Fusarium oxysporum:</i> 3.0 cm 3.0 cm	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
	BHI	<i>Fusarium oxysporum:</i> 1.0 cm 1.0 cm	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
1.	PDA	FB2: 4.0 cm 4.0 cm	PB01 PB02
	Sabouraud	FB2: 4.0 cm 4.0 cm	PB01 PB02
	BHI	FB2: 1.0 cm 2.0 cm	PB01 PB02
2	PDA	F1A: 4.0 cm 3.0 cm	PB03 PB04
	Sabouraud	F1A: 4.0 cm 4.0 cm	PB03 PB04
	BHI	F1A: 1.5 cm 0 cm	PB03 PB04
3	PDA	F14: 4.0 cm 4.0 cm	PB05 PB06
	Sabouraud	F14: 3.0 cm 4.0 cm	PB05 PB06
	BHI	F14: 0 cm 0 cm	PB05 PB06
4	PDA	F3: 3.0 cm 4.0 cm	PB07 PB08
	Sabouraud	F3: 3.0 cm 3.0 cm	PB07 PB08
	BHI	F3: 0 cm 0 cm	PB07 PB08

5	PDA	F4:	3.2 cm 2.8 cm	PB09 PB10
	Sabouraud	F4:	3.0 cm 4.0 cm	PB09 PB10
	BHI	F4:	0 cm 0 cm	PB09 PB10
6	PDA	F5A:	3.0 cm 2.0 cm	PB11 PB12
	Sabouraud	F5A:	3.0 cm 1.5 cm	PB11 PB12
	BHI	F5A:	1.4 cm 0.9 cm	PB11 PB12
7	PDA	F1B:	4.0 cm 4.0 cm	PB06 PB13
	Sabouraud	F1B:	2.8 cm 3.5 cm	PB06 PB13
	BHI	F1B:	1.3 cm 0.9 cm	PB06 PB13
8	PDA	F2A:	4.0 cm 4.0 cm	PB02 PB09.
	Sabouraud	F2A:	4.0 cm 2.8 cm	PB02 PB09.
	BHI	F2A:	2.2 cm 1.8 cm	PB02 PB09.
9	PDA	F5B:	4.0 cm 4.0 cm	PB04 PB12
	Sabouraud	F5B:	4.0 cm 4.0 cm	PB04 PB12
	BHI	F5B:	0 cm 0 cm	PB04 PB12
10	PDA	F9:	4.0 cm 4.0 cm	PB05 PB08
	Sabouraud	F9:	4.0 cm 4.0 cm	PB05 PB08
	BHI	F9:	0 cm 0 cm	PB05 PB08

11	PDA	F12: 4.0 cm 3.7 cm	PB07 PB10
	Sabouraud	F12: 3.9 cm 3.8 cm	PB07 PB10
	BHI	F12: 0 cm 0 cm	PB07 PB10
12	PDA	F13: 3.5 cm 4.0 cm	PB09 PB11
	Sabouraud	F13: 4.0 cm 4.0 cm	PB09 PB11
	BHI	F13: 3.5 cm 2.6 cm	PB09 PB11

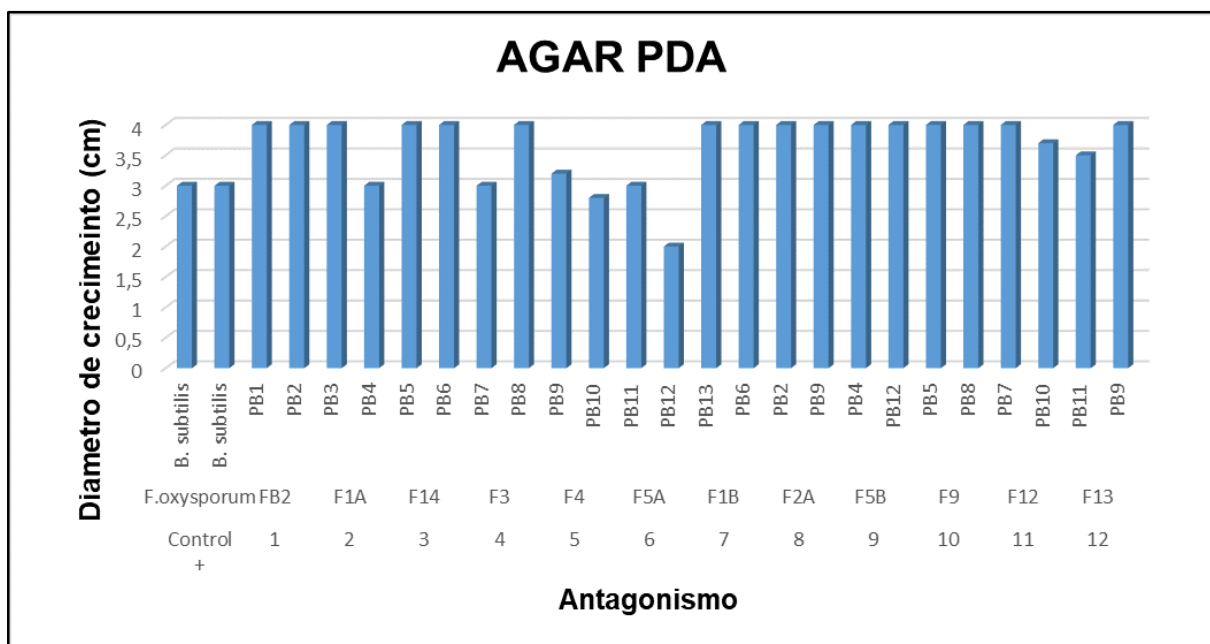


Figura 128. Antagonismo realizado en agar PDA, enfrentando los patógenos contra las bacterias biocontroladoras. Figura elaborada por las autoras

Como se puede observar, en los antagonismos realizados en el agar PDA la bacteria que demostró mejor antagonismo fue la PB12 frente al patógeno F5A del cual se obtuvo un crecimiento de 2.0 cm.

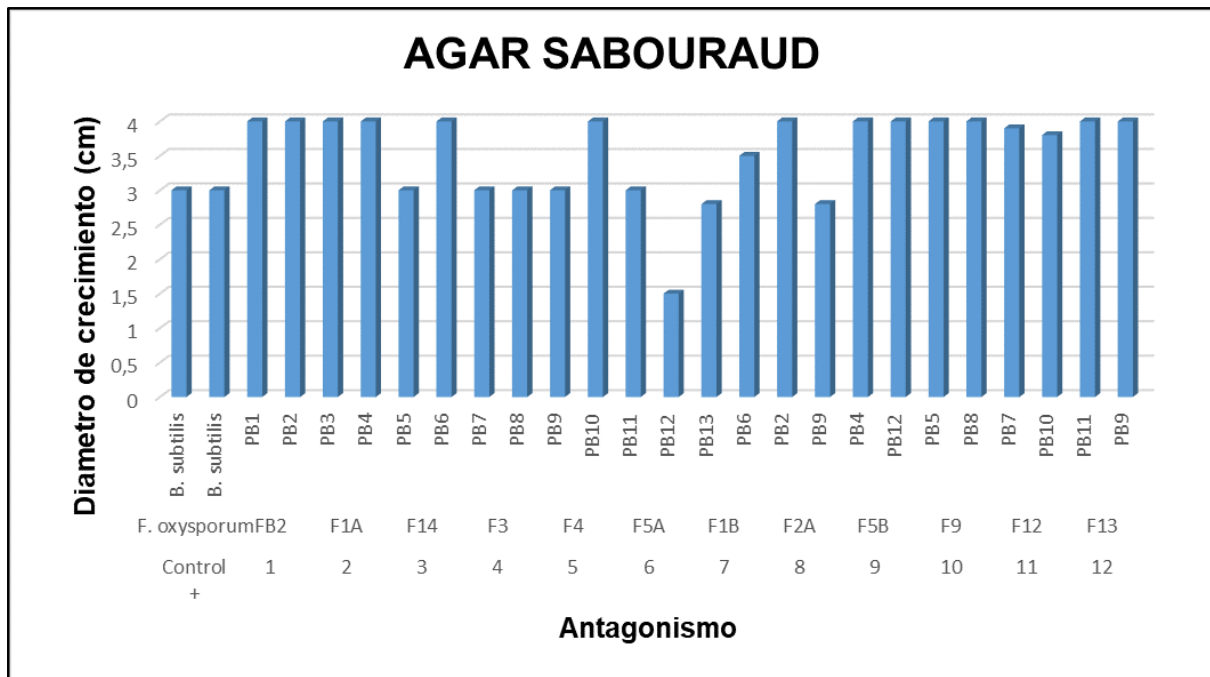


Figura 129. Antagonismo realizado en agar Sabouraud, enfrentando los patógenos contra las bacterias biocontroladoras. Figura elaborada por las autoras

En el Agar Sabouraud, se evidenció poca actividad antagónica con la mayoría de las bacterias, porque el diámetro de crecimiento obtenido por parte de los patógenos fue alto. Sin embargo, se observó que en el antagonismo 6, en el que se utilizó el patógeno F5A y el biocontrolador PB12 fue donde se presentó el menor diámetro de crecimiento con 1.5 cm.

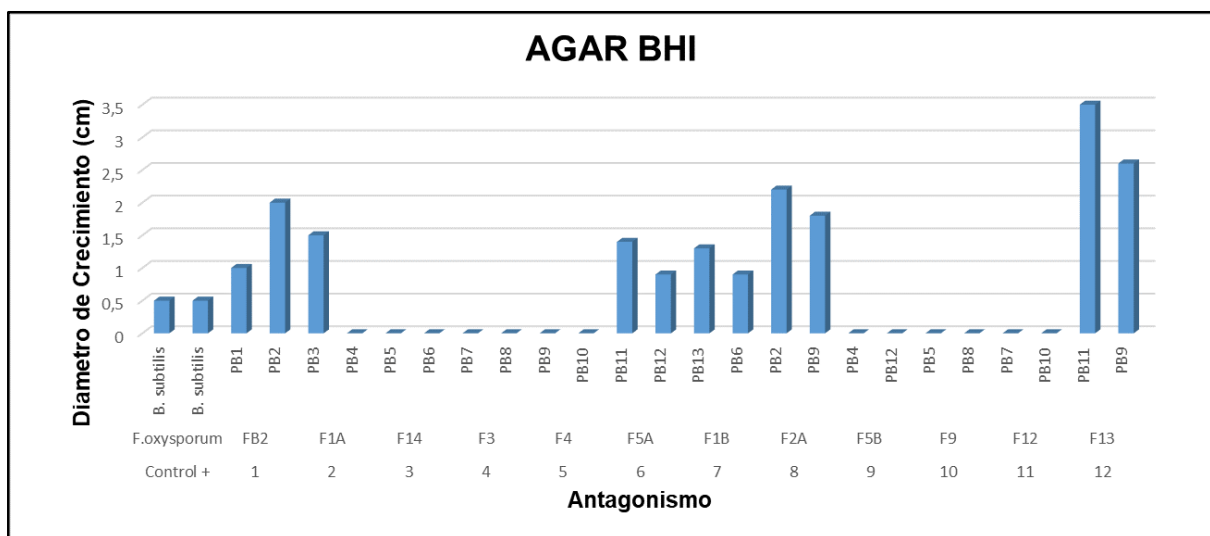


Figura 125. Antagonismo realizado en agar BHI, enfrentando los patógenos, contra las bacterias biocontroladoras. Figura elaborada por las autoras.

A diferencia de los dos medios anteriores, en el BHI se evidenció gran actividad antagónica, debido a que es el medio más adecuado para el crecimiento bacteriano. En los antagonismos 3, 4, 5, 9, 10, 11 ninguno de los patógenos creció frente a las dos bacterias que se realizó en cada uno, al igual que con el patógeno F1A con la bacteria PB4. En los siguientes antagonismos se obtuvo crecimiento de los patógenos, pero este fue menor a 1 cm; el patógeno FB2 y bacteria PB1, el patógeno F5A con la bacteria PB12 y el patógeno F1B con la bacteria PB06.

Las bacterias que presentaron el mejor comportamiento *in vitro* en todos los medios y que serían las que se probarían a futuro con los hongos fitopatógenos en pruebas controladas en campo son: PB12, PB07 y PB04.

7. DISCUSIÓN

La Fusariosis vascular, es una enfermedad que manifiesta un marchitamiento o secado de la planta, ya que afecta la base de las raíces y los tallos, como lo describe Gómez López en 2015, donde se identificaron 4 especies del género *Fusarium* como causantes de esta enfermedad, generando pérdidas del 20% en la producción de Maracuyá del departamento del Valle del Cauca, Colombia³⁷.

El muestreo del presente estudio se realizó en cuatro fincas del Municipio de Pasca, Cundinamarca, asociadas a la Federación Colombiana de Pasifloras, las cuales contaban con cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) y Maracuyá (*Passiflora edulis*), dichos cultivos manifestaban problemas de marchitez y clorosis en su tejido vegetal, por tal razón, se decidió tomar las muestras de suelo y material vegetal aleatoriamente. El muestreo se realizó en época de lluvia ya que está documentado que este clima favorece el crecimiento del hongo causante de la secadera. Como lo evidencia Hoyos y Ortiz en 2012, la sintomatología puede comenzar desde etapas tempranas en la plántula con signos claros de retraso en el crecimiento y clorosis leve en algunas hojas, es uniforme y se va extendiendo en toda la hoja. La siguiente etapa se enfoca en el marchitamiento de las ramas y una coloración rojiza en los haces vasculares; en estados avanzados se puede observar una clorosis generalizada, enrojecimiento en tallo, decoloración de la raíz y finalmente la necrosis de las raíces. En ciertos casos, se puede observar cómo surge el micelio del tallo de la planta³⁸. Las muestras que se tomaron en Pasca, Cundinamarca, presentaban los síntomas descritos por Hoyos y Ortiz y por lo tanto se garantiza que los microorganismos encontrados son los que están causando los problemas fitosanitarios en los cuatro cultivos muestreados.

De las muestras obtenidas, se lograron aislar 12 hongos del género *Fusarium* sp, únicamente de las muestras de suelo. Contaban con características macroscópicas y microscópicas compatibles con este género, como lo menciona Garcés de Granada y sus colaboradores en el año 2001, el género *Fusarium*, está descrito como un patógeno cosmopolita, saprófito del suelo, habitante natural del mismo y de material en descomposición que a nivel nacional es capaz de causar marchitez vascular en diferentes plantas, entre ellas las Pasifloras³⁹.

En cuanto a su morfología microscópica, Arbeláez Torres en el 2003, describe a *Fusarium* sp, como un hongo de crecimiento rápido, con tres tipos de esporas para su diseminación, las microconidias se describen como esporas unicelulares que pueden variar de tamaño y forma, entre elipsoidales a cilíndricas sin septos y hialinas; las macroconidias son largas, fusiformes, moderadamente curvas, cuentan con septos que varían de 3-5 y son hialinas. Por último, las clamidosporas, las cuales se forman por condensación de las macroconidias o células de las hifas, poseen paredes gruesas hialinas, esto con el fin de hacerlo resistente a condiciones ambientales poco favorables, favoreciendo su supervivencia⁴⁰. En el presente trabajo se encontraron conidios con las mismas características y, por lo tanto, su presencia permanente en suelos, se convierte en un problema constante para que se presente la enfermedad en los cultivos muestreados.

Tapia y Amaro en 2014, hacen una descripción macroscópica de *Fusarium*, como un hongo capaz de crecer en temperaturas que oscilan entre los 28°C a los 37°C, por lo que se denomina oportunista, los medios de cultivo que favorecen la visualización de los diferentes pigmentos que produce este género (café, blanco, rojo, gris, violeta, entre otros) y el diámetro de las colonias son el Agar Papa Dextrosa (PDA) y el Agar Sabouraud. Por lo anterior, el aislamiento y las pruebas in vitro, que se realizaron en este estudio se llevaron a cabo en estos dos medios para favorecer el crecimiento y visualización de los diferentes pigmentos encontrados en los doce patógenos aislados⁴¹.

Además, a estos hongos aislados se les realizó identificación por medio de pruebas moleculares en las cuales se utilizaron primers ITS1 e ITS4, de acuerdo con lo realizado por Woo en 2010, donde describe que estos primers tienen una longitud y secuencia relativamente conservada entre los hongos, pero se diferencian entre especies de hongos⁴⁷.

Por medio de las pruebas moleculares, se lograron identificar 8 hongos de los 12 aislados, cuatro fueron *Fusarium oxysporum*, dos *Fusarium solani*. Cubillos y colaboradores en 2011, probaron la patogenicidad de *Fusarium solani* en cinco plántulas sanas, mostrando sintomatología 14 días después de la inoculación⁴⁸. Este estudio se completa con la descripción que hace Bueno y sus colaboradores en el año

2013, donde aislaron hongos del género *Fusarium* sp y probaron su patogenicidad en plántulas de maracuyá, tomate, calabacín, soja, frijol y pepino y se observó que las plántulas más afectadas fueron las de maracuyá, tomate y calabacín. Sin embargo, tuvo mayor afectación en maracuyá. Adicionalmente, identificaron genotípicamente a los microorganismos y los identificaron como *Fusarium solani*⁴⁹. Por lo anterior, se puede afirmar que *Fusarium solani* es uno de los hongos de este género que más se aíslan en muestras obtenidas de plantas con clorosis, marchitamiento y necrosis foliar, hongo que fue caracterizado en el presente trabajo de investigación.

Fusarium oxysporum se describe como uno de los hongos de gran incidencia en pasifloras de la región bananera del Magdalena, llegando a causar hasta el 60% de las pérdidas de los cultivos de maracuyá en la zona⁵⁰. Para el 2016, Ortiz y Hoyos, describen dos métodos para la infección de *F. oxysporum* a plántulas de maracuyá, con el fin de evaluar la incidencia y severidad de los hongos en estas planas. Los investigadores encontraron sintomatología entre los 14 y 19 días de inoculación, y confirmaron la presencia de cuatro cepas altamente virulentas y presentaban sintomatología de necrosis descendente, marchitamiento y clorosis.⁵¹ Estos síntomas coinciden con los síntomas encontrados en los cultivos muestreados, por lo tanto, puede afirmarse que *Fusarium oxysporum* posiblemente se está combinando con *Fusarium solani* para enfermar los cultivos de Pasca, Cundinamarca.

De igual forma, se identificaron dos hongos de distintos géneros, *Phoma* sp y *Epicoccum nigrum*. Sobre *Phoma* sp, se puede describir su presencia en estos cultivos, como una enfermedad nueva en Gulupa. Como lo describe Sanabria en 2010, quien, por medio de aislamiento, identificación molecular y pruebas de patogenicidad, describió a *Phoma* sp como un patógeno causante de necrosis de tejidos (tallos, hojas y ramas)⁵², aunque no en cultivo de Pasifloras. Entonces, se puede inferir que habría una coinfección, en particular en los cultivos de la finca cuatro, pues fue en el único que se encontró este hongo.

Si bien el clima, la temperatura y las condiciones de humedad representan un factor relevante en la aparición de estos hongos, aunque no se realizó un estudio físico químico del suelo, se puede inferir que este suelo tiene problemas de fertilización y posiblemente una pobreza microbiana generalmente por la acidificación que sufren

por el desgaste y disminución de materia orgánica esto, debido al uso de agroquímicos que llegan a disminuir los microorganismos del suelo, Chaves y colaboradores en 2013, muestran el efecto que agroquímicos como Bisiribac, Malatión, Glifosato y Azoxystrobin tienen frente al crecimiento de microorganismo; evidenciaron que las bacterias Gram positivas y aquellas solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno se ven afectadas por estos agroquímicos en especial por el herbicida Bispiribac, por el lado de los hongos afectan el crecimiento de *Trichoderma*, *Penicillium* y *Fusarium*, pero algunos de ellos como el Malatión aumentan el crecimiento de este último⁵⁹

Con relación al aislamiento de microorganismos con posible capacidad biocontroladora, se encontraron 13 bacterias con las cuales se hicieron pruebas de antagonismo in vitro frente a los patógenos aislados. Uno de los microorganismos encontrados fue un coco Gram positivo del género *Staphylococcus*, una *Pseudomonas* spp y 11 bacterias que se identificaron del género *Bacillus*, por medios de pruebas bioquímicas. Koneman 2001, describe a este género como microorganismos bacilares Gram positivos formadores de endosporas, quimioheterótrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos periticos. Se puede encontrar en suelos y agua, donde intervienen en el ciclo del carbono y el nitrógeno⁴². Adicionalmente, Anderson y colaboradores 2003 manifiestan que la diferenciación entre especies se enfoca en la fermentación de lactosa, manitol, hidrólisis de la urea, y descarboxilación de la lisina ⁴³. Los resultados obtenidos en las pruebas en tubo y el sistema rápido de identificación, fueron los que permitieron identificar fenotípicamente a las bacterias Gram positivas dentro del género *Bacillus*.

En esta evaluación se tomaron tres medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Sabouraud y Agar BHI, con el fin de favorecer a unos y otros y observar si se presentaban diferencias en esta evaluación. Por otro lado, en el agar BHI, se obtuvieron 12 de los 13 biocontroladores con un diámetro de crecimiento fúngico, menor o igual a 1 cm, mostrando una actividad antagónica alta en la mayoría de microorganismos. Al respecto, el medio de cultivo BHI, como lo describe BD 2013, es un medio de cultivo rico en nutrientes por la infusión de cerebro y corazón por lo que es fuente hidrolítica de peptonas, que aportan fuentes de Nitrógeno, Carbono, Sulfuros, vitaminas, oligoelementos y Glucosa como azúcar fermentable; además, de

la presencia de fosfatos que tamponan el medio, por lo que es rico en nutrientes y es especial para el aislamiento de bacterias y levaduras⁴⁶. Por tal razón, es de mayor importancia aquellos biocontroladores que tuvieron una alta actividad antagónica frente a los patógenos en los medios donde las condiciones favorecen el crecimiento del patógeno, como las descritas anteriormente.

El control positivo fue *Fusarium oxysporum* como patógeno frente a *Bacillus subtilis* TB2, quien ha sido probado por el grupo Ceparium como biocontrolador y a quien se le ha demostrado presencia de iturina A, que tiene capacidad antifúngica, como lo afirmo Ariza y Sánchez en 2012⁵³. Adicionalmente, Oberá y colaboradores en 2014 describen que *Bacillus subtilis*, cuenta con una producción extracelular de antibióticos, toxinas, enzimas hidrolasas, proteasas, quitinasas y lipopéptidos antimicrobianos, los cuales tienen gran capacidad antifúngica, además, le confiere a la planta resistencia para ataques de hongos fitopatógenos como lo son hongos del género *Fusarium*⁴⁴. Álvarez y Sánchez en 2016 grupo Ceparium, evaluó el crecimiento de distintas cepas de *Bacillus* sp en distintas concentraciones de sal para posteriormente enfrentar a hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, donde encontraron que las cuatro cepas fueron *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus cereus*. Las anteriores bacterias mostraron una alta actividad antagónica frente a los patógenos⁵⁴. Lo anterior, hace de *B. subtilis* de las mejores bacterias para el control del patógeno causante de la secadera.

De acuerdo con las investigaciones previas obtenidas por el grupo Ceparium y la revisión de literatura presentada, en este trabajo también se encontraron cuatro biocontroladores que presentaron antagonismos altos PB07, PB09, PB11, PB12. Tres de las bacterias son del género *Bacillus* spp, como lo describe, Salas Torres 2015, se observa que las bacterias aisladas de suelos de cultivos sanos del género *Bacillus* sp, tuvo un antagonismo del 56.8% y una actividad antifúngica del 1,02 cm frente a *Fusarium oxysporum*, en cultivos de Banano en la región costa de Ecuador⁴¹. Por otro lado, Cazorla y colaboradores 2007, realizaron pruebas de antagonismo in vitro, en plantas de aguacate, donde obtuvieron 30 % de antagonismo con bacterias del género *Bacillus* sp, frente a diferentes hongos fitopatógenos entre ellos *Fusarium* sp⁴⁵. De igual manera, Tejera y colaboradores en 2011, resaltan los mecanismos por los cuales las bacterias del género *Bacillus*, están dentro de las más adecuadas para el

control de fitopatógenos como *Fusarium* sp; en el estudio, muestran que estas bacterias cuentan con diversos mecanismos para el control de fitopatógenos. Entre ellos se encuentran la producción de antibióticos como la Fegcina y Zwittermicina, las cuales actúan sumiendo el crecimiento del hongo, adicionalmente, aumenta la producción de toxinas con acción insecticida. Por otro lado, la producción de sideróforos, hace de *Bacillus* sp, un mejor captador de Hierro, ya que se excreta el sideróforo, este capta el hierro haciendo un complejo, se une a la célula por medio de receptores de membrana, una vez este intracelular se puede dar la reducción del hierro o la hidrólisis del sideróforo, de esta manera captar con mayor facilidad el hierro del medio ambiente, haciéndolo más competitivo por los nutrientes. Adicionalmente, estas bacterias son fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato, lo que conlleva a un aumento el crecimiento de las plantas. 64 De igual manera, Villarreal y colaboradores 2018, afirman que *Bacillus* sp tiene diversos métodos para lograr un control biológico efectivo, entre ellos se encuentra la producción de lipopéptidos, los cuales actúan como antibióticos y se dividen en tres familias, las uterinas fungicidas y surfactinas, estas, actúan frente a la membrana citoplasmáticas de células fúngicas formando poros, desbalance osmótico, alteración en la homeostasis del calcio, metabolismo energético y procesamiento del RNA. Además de este mecanismo, mencionan que este género es capaz de desarrollar enzimas líticas, este método es utilizado en hongos fitopatógenos ya que estas enzimas van a degradar la pared celular de estos agentes patógenos, rompen los enlaces glucosídicos provocando su lisis y muerte celular. Entre estas enzimas se encuentran las cutinasas y β -glucanasa 67. Por lo anterior, se considera que las bacterias del género *Bacillus* sp tienen un arsenal sustancias que llegan a hacer un buen control biológico sin dejar atrás la sinergia con las plantas.

En el caso del presente trabajo, se encontró que la bacteria que tuvo el mejor antagonismo en estos medios fue PB12, identificada con pruebas bioquímicas en el género *Bacillus* sp y con pruebas rápidas BBL Crystal como *Paenibacillus alvei*, Este resultado debe ser confirmado con pruebas de biología molecular.

El biocontrolador PB11 se logró identificar como una bacteria del género *Staphylococcus* sp, la cual mostró un antagonismo de 3 cm en los dos medios de cultivo para hongos. De esta bacteria no se documenta actividad antagónica frente

hongos fitopatógenos y la literatura orienta a que es una bacteria que puede causar infecciones al humano. Sin embargo, por tratarse de un coco Gram positivo patógeno en los humanos se descarta como opción para pruebas de biocontrol.

Por último, en el Agar Sabouraud, se observó una actividad antagónica alta en la bacteria PB08, la cual se identificó como *Pseudomonas* spp, mostrando un diámetro de crecimiento del patógeno de 3 cm. Avendaño y colaboradores en 2006, mostraron que al hacer un antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens*, tuvo una inhibición parcial en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, por lo que recomiendan otro microorganismo para el control de este patógeno ⁴⁶.

El fin de esta esta investigación, es llevar estas cuatro bacterias con alta actividad antagónica a solucionar el problema fitosanitario que se presenta en las fincas muestreadas del municipio de Pasca, Cundinamarca. Para esto, Falicol y colaboradores en 2007, probaron la actividad antagónica de *Bacillus* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium roseum* en semillas de soja, en donde pasado 2 meses de crecimiento se observó que los ensayos donde se aplicó *Bacillus* sp en concentración de 2.1×10^{10} UFC/mL teniendo mejor actividad que el fungicida Carboxin+Thiram ⁵⁵. De igual forma, Caviedes en 2010 enfrenta a *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp contra *Fusarium oxysporum* en semillas de uchuva. Donde *Bacillus* sp mostró un porcentaje de iniciación de 63% frente a al patógeno, en comparación de 30% de inhibición de *Pseudomonas* sp. Estos ensayos se hicieron en concentraciones 1.2×10^9 UFC/ mL ⁵⁶. En 2013 Sarti y Silva, probaron la inhibición de cepas de *Bacillus subtilis* ATCC6633, *B. amylolyticus*, *B. subtilis* var. natto y *B. subtilis* var. Probando en dos métodos de inoculación de semillas de soja con dichas bacterias de 1×10^8 UFC/ mL y otro 1.5×10^8 UFC/ mL frente a *Fusarium solani*. Estas bacterias lograron disminuir el crecimiento de *F. solani* en un 50% adicionalmente, lograron incrementar el crecimiento de las plántulas en 125% con los dos métodos de inoculación empleados⁵⁷. Lo anterior, afirma a las bacterias del género *Bacillus* sp tienen la mayor capacidad de inhibición de crecimiento de estos hongos fitopatógenos en pruebas in vivo, adicional a este proceso pueden llegar a fomentar el crecimiento de la plántula y se evidencia en diversos casos un mayor control de esta enfermedad que los fungicidas. Por tal razón, el control de *Fusarium* sp con microorganismos, es una buena alternativa para mitigar las pérdidas por esta enfermedad y a su vez, es

benéfico para el crecimiento de las plantas. El muestreo del presente estudio se realizó en cuatro fincas del Municipio de Pasca, Cundinamarca, asociadas a la Federación Colombiana de Pasifloras, las cuales contaban con cultivos de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) y Maracuyá (*Passiflora edulis*), dichos cultivos manifestaban problemas de marchitez y clorosis en su tejido vegetal, por tal razón, se decidió tomar las muestras de suelo y material vegetal aleatoriamente. El muestreo se realizó en época de lluvia ya que está documentado que este clima favorece el crecimiento del hongo causante de la secadera. Como lo evidencia Hoyos y Ortiz en 2012, la sintomatología puede comenzar desde etapas tempranas en la plántula con signos claros de retraso en el crecimiento y clorosis leve en algunas hojas, es uniforme y se va extendiendo en toda la hoja. La siguiente etapa se enfoca en el marchitamiento de las ramas y una coloración rojiza en los haces vasculares; en estados avanzados se puede observar una clorosis generalizada, enrojecimiento en tallo, decoloración de la raíz y finalmente la necrosis de las raíces. En ciertos casos, se puede observar cómo surge el micelio del tallo de la planta.³⁸ Las muestras que se tomaron en Pasca, Cundinamarca, presentaban los síntomas descritos por Hoyos y Ortiz y por lo tanto se garantiza que los microorganismos encontrados son los que están causando los problemas fitosanitarios en los cuatro cultivos muestreados.

8. CONCLUSIONES

- Se aislaron 12 hongos del género *Fusarium* sp, considerados patógenos para la variedad Pasifloras. La caracterización se realizó tanto por análisis fenotípicos como la confirmación por técnicas de Biología molecular Genotípicamente, 4 fueron *Fusarium oxysporum*, 2 *Fusarium solani*, 1 *phoma* sp y 1 *Epicoccum nigrum*
- Se aislaron 13 bacterias a las cuales se les verificó su antagonismo *in vitro* de las cuales, 11 fueron *Bacillus* sp, un *Staphylococcus* y una *Pseudomonas* sp.
- Las pruebas de antagonismo permitieron establecer que cuatro bacterias (PB04, PB07, PB11 Y PB12) fueron las que obtuvieron los mejores resultados al inhibir el crecimiento de los patógenos. La bacteria PB12 la cual se identificó fenotípicamente como *Bacillus* sp, tuvo la mejor actividad antagónica en los tres medios que se utilizaron en el estudio
- La bacteria PB11 identificada como *Staphylococcus* sp fue descartada por su patogenicidad para los humanos.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar pruebas *in vivo* en plántulas de Gulupa y Maracuyá y una vez obtenido los resultados, hacer las pruebas finales en campo en cada uno de los cultivos muestreados.

Adicionalmente, hacer la identificación con biología molecular de las bacterias que mostraron una alta actividad antagónica.

Finalmente, hacer transferencia de conocimientos a la comunidad de agricultores asociados a la Federación Colombiana de Pasifloras en el municipio de Pasca-Cundinamarca para mostrarles otro tipo de control de enfermedad Fusariosis Vascular o “Secadera” sin dañar el entorno ambiental y social con tratamientos químicos.

10. REFERENCIAS

¹ Sociedad Colombiana de Ciencias hortícolas. Cultivo poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: Maracuyá, gulupa y curuba. [Internet] 2009 [Citado 2018 Febrero 19] 48 (1). Disponible en: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_118_cultivo_poscosechavp.pdf

² Ministerio de agricultura. Cadena de Pasifloras, indicadores e instrumentos, Mayo - junio de 2018. [Internet] 2018 [Citado 2019 Abr 19]. Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/002%20-%20Cifras%20Sectoriales/002%20-%20Cifras%20Sectoriales%20-%202018%20Mayo%20Pasifloras.pdf>

³ Castaño, Zapata J. Enfermedades importantes de las pasifloráceas en Colombia [Internet] 2009 [Citado 2018 Febrero 20] Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Gerhard_Fischer/publication/259346111_Cultivo_poscosecha_y_comercializacion_de_las_pasifloraceas_en_Colombia_maracuya_granadilla_gulupa_y_curuba/links/55e0d5b108aeb1a7cc58e7b/Cultivo-poscosecha-y-comercializacion-de-las-pasifloraceas-en-Colombia-maracuya-granadilla-gulupa-y-curuba.pdf#page=224

⁴ Villegas B, Ocampo J, Castillo CF. Principales enfermedades en el cultivo de Gulupa y su manejo [Internet] 2012 [Citado 2017 Septiembre 20] 1. Disponible en : https://www.researchgate.net/profile/John_Ocampo/publication/259946957_Tecnologia_para_el_cultivo_de_la_Gulupa_en_Colombia_Passiflora_edulis_f_edulis_Sims_Purple_Passion_Fruit/links/0deec52ea81e0430ca000000.pdf#page=55

⁵ Cole DI, Hedges TR, Ndoea T. Wilt of passion fruit (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) caused by *Fusarium solani* and *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* [Internet] 1992 [Citado 2018 Abril 07]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670879209371728>

⁶ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Manual de manejo preventivo de la Secadera (*Fusarium sp*) en cultivo de Maracuyá. [Internet] 2008 [Citado 2018 Abril 07] Disponible en:

<http://huila.gov.co/documentos/M/manejo%20preventivo%20de%20la%20secadera%20para%20maracuya%20en%20el%20Huila.pdf>

⁷ Suarez CL, Fernandez RJ. Antagonismo In Vitro de *Trichoderma harzianum* rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht F. sp *passiflorae* en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var *Flavicarpa*) del municipio zona bananera Colombiana [Internet] 2009 [Citado 2018 Abril 07] Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100001

⁸ Ortiz M, Hoyos L. Description of the symptomatology associated with Fusariosis and comparison with other diseases for the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) in the Sumapaz region (Colombia) [Internet] 2012 [Citado 2018 Abril 07] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v6n1/v6n1a11.pdf>

⁹ Ocampo J, Wyckhuys K. Tecnología para el cultivo de Gulupa en Colombia (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) [Internet] 2010 (1) [Citado 2018 Abril 07] Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/John_Ocampo/publication/259946957_Tecnologia_para_el_cultivo_de_la_Gulupa_en_Colombia_Passiflora_edulis_f_edulis_Sims_Purple_Passion_Fruit/links/0deec52ea81e0430ca000000.pdf#page=55

¹⁰ Cruz M. Respuesta fisiológica y bioquímica de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) afectada por fusariosis (*Fusarium sp*) [Internet] 2012 [Citado 2018 Abril 07] Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9900/1/790769.2012.pdf>

¹¹ Ferreira N, Acosta AA, Moraes F, Silva C, Oliveira I. Residuos orgánicos en el control de *Fusarium oxysporum f. sp. Passiflorae* en Maracuyá amarillo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) D digital [Internet] 2015 [Citado 2018 Abril 07] Disponible en: https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/44720/pdf_9_final

¹² Da Costa S, Pereira SL, Serafim M, Horst C, Araujo K, Grillo L. Early selection of *Passifloras species* resistant to fusariosis. Summa phytopathol [Citado 2018 Abril 07] (43) (1) Botucatuout./dez.2017

- ¹³ Natural Resources Conservation Services. United States Department of Agriculture. [Internet] [Citado 2019 Marzo 27] Disponible en: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=PASSI&display=31>
- ¹⁴ Fisher G. Condiciones ambientales que afectan crecimiento, desarrollo y calidad de las passifloráceas.[Internet] [Citado 2019 Febrero 20] Disponible en: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_140_Condiciones_ambientales.pdf
- ¹⁵ Fisher G, Casierra PF, Piedrahita W. Ecología de las especies *Passifloraceas* Cultivadas en Colombia, en cultivo poscosecha y comercialización de las pasifloras en Colombia: Maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.[Internet] 2009. [Citado 2018 Agosto 27] Disponible en: <http://fedepasifloras.org/es/wp-content/uploads/2018/01/Cultivo-poscosecha-y-comercializacio%CC%81n-de-las-pasiflora%CC%81ceas-en-Colombia.pdf>
- ¹⁶. Instituto Colombiano Agropecuario. Manejo fitosanitario del cultivo de granadilla (*Passiflora ligularis*) medidas para la temporada invernal [Internet] 2011 [Citado 2017 Septiembre 20] 1(5-8) Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getattachment/ee408b8b-fd44-4cca-bf0b-44b6c34972e9/-nnbsp;Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Granadilla.aspx>.
- ¹⁷. Instituto colombiano agropecuario (ICA). Manejo integrado del cultivo de Curuba (*Passiflora tripartita* var *mollissima* Holm Nielsen & Jorgensen) [Internet] [Citado 2019 Mayo 20]. Disponible en: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/15368>
- ¹⁸. Asohofrucol, Fondo Nacional de fomento hortifrutícola. [Internet] 2018. [Citado 2019 Abril 03] Disponible en: http://www.asohofrucol.com.co/fruta_detalle.php?id=19
- ¹⁹. Gobernación del Huila. Secretaría de agricultura y Minería. Manual técnico del cultivo de Maracuyá (*Passiflora edulis*) en el Departamento del Huila. [Internet] 2006 [Citado 2018 Septiembre 06] Disponible en: <http://huila.gov.co/documentos/M/manual%20tecnico%20del%20maracuya%20en%20el%20Huila.pdf>

²⁰. Gobernación de Antioquia, SENA. Manual Técnico del Cultivo de Maracuyá bajo Buenas Prácticas Agrícolas. [Internet] 2014 [Citado 2019 Abril 08] Disponible en: https://issuu.com/yosephcronwellojeda/docs/maracuya_bpa_0_2?fbclid=IwAR1qtbOTGw7kXq-LBcPI13z42HFhqbiDukWD7cwVYLiWXR3UpwiZAt2LYQ

²¹. Manual de cultivo de Maracuyá. Disponible en: http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20MARACUYA_0.pdf

²². Romero AC, González A. Centro internacional de Agricultura tropical. Principales plagas y enfermedades que afectan los cultivos de Maracuyá. Información tomada de Cultivo de Maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) establecido con Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el Centro Internacional de Agricultura Tropical. [Internet] 2012 [Citado 2019 de Abril 09]. Disponible en: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/biblioteca/cultivo%20de%20maracuya%20establecido%20con%20buenas%20practicass%20agricolas%20....pdf

²³. Cámara de comercio de Bogotá, Vicepresidencia de Fortalecimiento Empresarial, Programa de Apoyo Agrícola y Agroindustrial. Manual de Gulupa. [Internet] 2015 [Citado 2019 Abril 04]. Disponible en: <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/handle/11520/14314>

²⁴. Flórez L, Pérez L, Melgarejo L. Universidad Nacional de Colombia. Manual calendario fenológico y fisiología del crecimiento y desarrollo del fruto de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) de tres localidades del departamento de Cundinamarca. [Internet] 2012 [Citado Marzo 07 de 2019] Disponible en: [http://unal.edu.co/resultados-de-la-busqueda/?q=MANUAL%20CALENDARIO%20FENOL%C3%93GICO%20Y%20FISIOLOG%C3%8DA%20DEL%20CRECIMIENTO%20Y%20DESARROLLO%20DEL%20FRUTO%20DE%20GULUPA%20\(Passiflora%20edulis%20Sims\)%20DE%20TRES%20LOCALIDADES%20DEL%20DEPARTAMENTO%20DE%20CUNDINAMARCA](http://unal.edu.co/resultados-de-la-busqueda/?q=MANUAL%20CALENDARIO%20FENOL%C3%93GICO%20Y%20FISIOLOG%C3%8DA%20DEL%20CRECIMIENTO%20Y%20DESARROLLO%20DEL%20FRUTO%20DE%20GULUPA%20(Passiflora%20edulis%20Sims)%20DE%20TRES%20LOCALIDADES%20DEL%20DEPARTAMENTO%20DE%20CUNDINAMARCA)

- ²⁵. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Manejo de problemas fitosanitarios del Cultivo de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) Medidas para la temporada invernal. [Internet] 2011 [Citado 2019 Abril 08] Disponible en:
<https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/Manejo%20de%20problemas%20fitosanitarios%20del%20cultivo%20de%20gulupa.%20Medidas%20para%20la%20temporada%20invernal..pdf>
- ²⁵. Figueroa MG, Rodriguez R, Guerrero BZ, Marin M. Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. [Citado 2018 Mayo 15] [Internet] 2010 Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018533092010000200005&script=sci_arttext&tlng=en
- ²⁶. Pérez L. Las mejores prácticas para la prevención de la raza cuatro tropical de la marchitez por *Fusarium* y otras enfermedades exóticas en fincas bananeras. [Internet] 2015 [Citado 2019 Marzo 03]. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/316790944_LAS_MEJORES_PRACTICAS_PARA_LA_PREVENCION_DE_LA_RAZA_4_TROPICAL_DE_LA_MARCHITEZ_POR_FUSARIUM_Y_OTRAS_ENFERMEDADES_EXOTICAS_EN_FINCAS_BANANERAS_BANANA_FARM_BEST_PRACTICES_FOR_PREVENTION_OF_FUSARIUM_WILT
- ²⁷. Vargas M, *Fusarium solani*: agente causal de la producción del cogollo. Revista Palmas. [Internet]. 2000. [Citado 2017 sep 29]. 13; 59-67. Disponible en:
<file:///C:/Users/EQUIPO/Downloads/331-331-1-PB.pdf22>.
- ²⁸. Villa A, Pérez R, Hernández HA, Basurto M, Soto JM, Martínez E. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Scielo.[Internet].2014. [Citado en 2017 sep 07]. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012028122015000200011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- ²⁹. Camacho N, Gil J. Evaluación preliminar de modelos de infección cruzada por *Fusarium* sp aislados de procesos patológicos en plantas, humanos y animales.

Pontificia Universidad Javeriana. [Internet]. 2008. [Citado en 2017 sep 07].
Disponibile en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis118.pdf>

³⁰. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). NCBI [Intenet] 2014 [Citado 2019 Abril 03] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>.

³¹. Research article ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-10-189>

³². Rodríguez AF. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Universidad Pontificia Javeriana de Colombia [Internet] 2007 [Citado 2019 Abril 08]. Disponible en: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>

³³ Yun Lee P, Costumbrado J, Yuan C, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. NCBI [Internet] 2012 [Citado 2019 Abril 03]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/>

³⁴. Serrano L, Galindo E. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario [Internet]. México: Ciencia; 2007 [cited 13 October 2017]. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf>

³⁵. Alexandra ST, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Determinación del antagonismo in vitro de *Bacillus spp.* aislado del suelo de los cultivos de banano de la región costa del ecuador frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum f* cubense raza tropical. [Internet] 2015 [Citado 2019 Abril 08] Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/10162/Salas%20Veronica.pdf?seque>

³⁶. Kumar RC, Dubey DK, Maheshwari. Las cepas de *Bacillus* aisladas de la rizosfera mostraron una actividad antagónica y promotora del crecimiento de las plantas contra los fitopatógenos. [Internet] 2012 [Citado 2018 Septiembre 01]

Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501312000602>

37. Agencia de noticias. Universidad Nacional de Colombia. Identifican hongos causantes de la “secadera” en el Maracuyá. [Internet] 2015 [Citado 2019 Abril 10] Disponible en: <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/identifican-hongos-causantes-de-la-secadera-en-el-maracuya.html>
38. Ortiz E, Hoyos L. Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia) [Internet] 2012 [Citado 2019 Abril 11 de 2018] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v6n1/v6n1a11.pdf>
39. Garces E, Orozco M, Bautista GR, Valencia H. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. [Internet] 2001 [Citado 2019 Abril 09] Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63462/pdf>
40. Arbelaez G. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. [Internet] 2000 [Citado 2019 Abril 10]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21538/22543>
41. Revista chilena infectol. Género *Fusarium*. [Internet] 2014 [Citado 2019 Abril 10] Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>.
42. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2001 [Citado 2019 Abril 10]
43. Anderson TH. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality *Ag Ecosys Environ.*98:285-293. 2003 [Citado 2019 Abril 10]
44. Orbera T, Serrat MJ, Ortega E. Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. [Internet] [Citado 2019 Abril 09] Disponible en: <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2014/31/1/336-01-13.pdf>
45. Cazorla FM, Romero D, Perez A, Lugtenberg BJJ, Vicente A Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado

rhizoplane displaying biocontrol activity. [Internet] 2007 [Citado 2019 Abril 10]
Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x>

46. Avendaño C, Arbelaéz G, Rondon G. Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* en frijo *Phaseolus vulgaris* L, mediante la acción combinada de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma sp* y *Pseudomonas fluorescens*. 2006 [Citado 2019 Abril 09] Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652006000100008

47. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kausrud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*. 2010;10(1):189.

48. Cubillos JG, Paéz A, Mejía L. Evaluation of the biocontrol capacity of *Trichoderma harzianum* Rifai against *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Associated to the complex “Dryer” in passion fruit under greenhouse conditions. [Cited the 2019 Apr 12] 2011; 64(1): 5821-5830. Available in: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472011000100008

49. Bueno CJ, Fisher IH, Rosa DD, Firmino AC, Harakava R, Oliveira CM, Furtado EL. *Fusarium solani f. sp. passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. *Plant pathology*. [Cited the 2019 Apr 12] 2014; 63: 382-389. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12098>

50. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. 2006. Coordinación de investigación y Coordinación financiera. Estación Experimental Caribia. Sevilla, Colombia.

51. Ortiz E, Hoyos L. Standard methods for inoculations of *F. oxysporum* and *F. solani* in *Passiflora*. *African Journal of Agricultural Research*. [Cited the 2019 Apr 12] 2016; 11(17): 1569-1575. Available in: https://www.researchgate.net/profile/Lilliana_Hoyos-Carvajal/publication/301826236_Standard_methods_for_inoculations_of_F_oxyspor

um_and_F_solani_in_Passiflora/links/57d8391408ae0c0081edf83f/Standard-methods-for-inoculations-of-F-oxysporum-and-F-solani-in-Passiflora.pdf

⁵². Sanabria NM. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de Ciencias. Programa de microbiología agrícola y veterinaria. Reconocimiento en enfermedades en Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en el departamento de Boyacá. [Citado 2019 Abr 12] 2010. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8664/tesis617.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

⁵³. Ariza Y, Sánchez LC. Determination of secondary metabolites from *Bacillus subtilis* with effect biological control on *Fusarium* sp. NOVA. [Cited the 2019 Apr 12] 2012; 10 (18): 135 - 250. Available in: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a01.pdf>

⁵⁴. Castañeda, Sánchez LC. Evaluation of growth of four species of the genus *Bacillus* sp., the first step to understand their biocontrol effect on *Fusarium* sp. NOVA. [Cited the 2019 Apr 12] 2016; 13 (26): 53-65. Available in: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-24702016000200006&lng=en&nrm=iso

⁵⁵. Falico L, Visintin G, García B, Alcaraz E. Implantación de soja con microorganismos biocontroladores. *Agricultural Sciences - Medical Sciences* [Citado 2019 Abr 12] 2007 Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/145/14503508.pdf>

⁵⁶ Caviedes DC. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Aislamiento y selección de *Pseudomonas* sp, y *Bacillus* sp., promotoras del crecimiento vegetal en cultivo de Uchuva (*Physalis peruviana* L) con actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum*. 2010 [Cited the 2019 Apr 12] Disponible en: <http://www.labamerec.com/images/nov028/2010-Aislamiento-y-seleccion-Pseudomonas-Bacillus.pdf>

⁵⁷ Sarti GC, Miyazaki SS. *Bacillus subtilis* crude extracts with antifungal activity against soybean (*Glycine max*) phytopathogens and *Bradyrhizobium japonicum* coinoculation effect. [Cited the 2019 Apr 12] 2013; 47: 373-383. Available in:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952013000400006&script=sci_arttext

⁵⁸ Exportube. [Internet] [Citado el 2019 Jun 12] Disponible en: <http://exportube.com/?product=granadilla>

⁵⁹ Hernández L, Munive JA, Sandoval E, Martínez D, Villegas MC. Efectos de las prácticas agrícolas sobre las poblaciones bacterianas del suelo en sistemas de cultivo en Chihuahua, México. SCIELO [Internet] 2013 [Citado el 2019 Jun 12]; 4 (1): 353-365. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342013000300002&script=sci_arttext&lng=en

⁶⁰ Yo merco fácil. [Internet] Cali: Ikkonos [Citado el 2019 Jun 12] Disponible en: <https://yomercofacil.com/productos/curuba/>

⁶¹ Pinterest. Ramírez A. [Internet] [Citado el 2019 Jun 12] Disponible en: <https://co.pinterest.com/pin/425308758540939288/?lp=true>

⁶² Blogger. [Internet] Melissa; 2011 [Citado el 2019 Jun 12] Disponible en: <http://www.maracuyacom-melissa.blogspot.com/2011/04/la-maracuya.html>

⁶³ Agronegocios. [Internet] Bogotá; Ximena González [Actualizado el 2019 Ene 24; Citado el 2019 Jun 12]. Disponible en: <https://www.agronegocios.co/agricultura/pasifloras-se-abren-paso-en-el-exterior-2622428>

⁶⁴ Tejera B, Rojas MM, Heydrich M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. CENIC. [Internet]. 2011. [Citado el 2019 Jun 12]; 42 (3): 131-138. Disponible en: <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/Articulo%20No%204%20B28-10%20pp.131-138.pdf>

⁶⁵ Infante D, Martínez B, González N y Reyes Y. *Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogenic fungi. SCIELO [Internet] 2009 [Cited the 2019 Jun 12]; 24 (1): 14-21. Available in: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

⁶⁶ UNIMEDIOS. Identifican hongos causantes de la “Secadera” en el maracuyá. [Internet] Palmira: Agencia de noticias UN; 2015.[Citado el 2019 Jun 12] Disponible en: <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/identifican-hongos-causantes-de-la-secadera-en-el-maracuya.html>

⁶⁷ Villarreal MF, Villa ED, Cira LA, Estrada MI, Parra FI, Villalobos S. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. SCIELO [Internet] 2018 [Citado el 2019 Jun 12]; Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092018000100095&lng=es&nrm=iso&tlng=es

⁶⁸ Montoya E. Evaluación del impacto económico de las principales enfermedades que afectan el cultivo de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims) UNAL[Internet] [Citado el 2019 Jun 12] Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/9840/1/emmymontoyavelosa.2012.pdf>

11. ANEXOS

Anexo1. Protocolo de Secuenciación. Manual de secuenciación automática, en la cual se describe

En tubos de 0.2 ml (tubos de PCR):	
DNA	
Doble cadena	200-500 ng
Cadena sencilla	50-100 ng
Cósmidos	0,5 - 1 µg
ADN genómico bacteriano	2,0 - 3,0 µg
Fragmento de PCR	10-20 ng /100 pb
Primer	
	3.2 pmoles
Completar con H ₂ O hasta 6 µl (No utilizar NUNCA TE)	

Esta tabla encuentra la equivalencia entre ng y pmoles para oligos de distintas longitudes:

Longitud del primer	ng de primer equiv. a 10 pmol
16 mer	53 ng
17 mer	57 ng
18 mer	60 ng
19 mer	63 ng
20 mer	67 ng
24 mer	80 ng
27 mer	90 ng
31 mer	103 ng