



**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS CON ACCIÓN FITOPATÓGENA EN  
CULTIVOS DE PASIFLORAS (GULUPA Y GRANADILLA) PROCEDENTES DE  
FINCAS EN CUNDINAMARCA**

**VALENTINA HENAO BUSTOS  
LUISA FERNANDA SANDOVAL SEGURA  
Proyecto de grado**

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

**BOGOTÁ, OCTUBRE 2021**



**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS CON ACCIÓN FITOPATÓGENA EN  
CULTIVOS DE PASIFLORAS (GULUPA Y GRANADILLA) PROCEDENTES DE  
FINCAS EN CUNDINAMARCA**

**VALENTINA HENAO BUSTOS  
LUISA FERNANDA SANDOVAL SEGURA  
Proyecto de grado**

**Asesora interna  
Mg. LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**BOGOTÁ D.C., OCTUBRE 2021**



**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS CON ACCIÓN FITOPATÓGENA EN  
CULTIVOS DE PASIFLORAS (GULUPA Y GRANADILLA) PROCEDENTES DE  
FINCAS EN CUNDINAMARCA**

**APROBADA:** \_\_\_\_\_

**JURADOS: Vilma Yamile Martínez Granados**

\_\_\_\_\_  
**Ana Graciela Lancheros Díaz**  
\_\_\_\_\_

**Asesora interna**  
**Mg. LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**BOGOTÁ D.C., OCTUBRE 2021**

## Dedicatoria

*El presente proyecto está dedicado especialmente a nuestra familia y amigos quienes nos apoyaron, acompañaron y animaron a lo largo de toda nuestra carrera universitaria, aportando a nuestra formación profesional y como ser humano dándonos la fuerza para seguir adelante en nuestro aprendizaje.*

## **Agradecimientos**

Expresamos nuestro más sincero agradecimiento:

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca que dispuso a nuestro favor las instalaciones, los equipos, los instrumentos, al personal de apoyo y donde adquirimos los conocimientos necesarios para realizar nuestro proyecto.

A Nuestra asesora Ligia Consuelo Sánchez Leal, por su tiempo, apoyo, cariño, consejos y los conocimientos brindados que sirvieron como pilar para este proceso de aprendizaje e investigación.

A Martha Lucía Posada Buitrago a quien le debemos el tiempo y experiencia con la que nos orientó en cada momento.

Al grupo de investigación Ceparium con el cual compartimos aprendizaje y a crecer como personas y como profesionales investigadores; gracias a ellos adquirimos los conocimientos y acceso a los equipos y herramientas para culminar nuestro proyecto. Y a nuestros compañeros del énfasis de ambiental quienes colaboraron con parte del trabajo experimental.

A la Federación Colombiana de Productores de Pasifloras, quienes nos permitieron conocer e identificar las fincas de Cundinamarca que presentaban problemáticas en sus cultivos de pasifloras, y a los agricultores que nos facilitaron las muestras y la información necesarias para llevar a cabo este trabajo.

Gracias a todas las personas que de una u otra manera apoyaron en la realización de este proyecto, a quienes recordaremos con gran cariño.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Págs.</b>
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	14
2.1.    Objetivo general	14
2.2.    Objetivos específicos	14
3. ANTECEDENTES	15
4. MARCO TEÓRICO	23
4.1.    Generalidades de las Pasifloras	23
4.2.    Pasifloras en Colombia	23
4.3.    Taxonomía de las pasifloras	23
4.4.    Gulupa ( <i>Passiflora edulis</i> var. <i>edulis sims</i> ) y granadilla ( <i>Passiflora ligularis</i> )	24
4.5.    Condiciones de cultivo	24
4.6.    Principales fitopatógenos que afectan a la gulupa y la granadilla	25
4.7.    Pérdidas de cultivos por fitopatógenos en Colombia	25
4.8.    Caracterización de hongos fitopatógenos	26
5. DISEÑO METODOLÓGICO	28
5.1.    Universo	28
5.2.    Población	28
5.3.    Muestra	28
5.4.    Hipótesis	28
5.5.    Recolección de muestras	28
5.6.    Aislamiento de microorganismos	30
5.7.    Pruebas de patogenicidad	30
5.8.    Caracterización molecular	31
5.8.1.    Extracción de de DNA	31
5.8.2.    Amplificación de la región ITS por PCR	31
5.8.3.    Secuenciación de productos de PCR y análisis de datos	33
6. RESULTADOS	34

6.1.	Identificación fenotípica	34
6.2.	Pruebas de patogenicidad	37
6.3.	Identificación molecular	38
6.4.	Secuenciación y análisis de datos	40
7.	DISCUSIÓN	41
8.	CONCLUSIONES	46
9.	RECOMENDACIONES	47
	REFERENCIAS	48
	ANEXOS	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Págs.</b>
Figura 1 Transporte de muestras, Grupo Ceparium 2020.	28
Figura 2 El Cuate Gachala - cultivos de gulupa, Grupo Ceparium 2020.	28
Figura 3 Bonanza, Supatá, Grupo Ceparium 2020.	29
Figura 4 Bonanza, Supatá - Cultivo de granadilla, Grupo Ceparium 2020.	29
Figura 5 GuCP1 Azul de lactofenol, Fruto en agar YGC. Autoras 2020.	33
Figura 6 GuCP2 Agar V8 (iz) - Sabouraud (der), Tallo. Autoras 2020.	33
Figura 7 GuCP2 Azul de lactofenol, Tallo. Autoras 2020.	33
Figura 8 GuCP3 Agar PDA, Tallo. Autoras 2020.	33
Figura 9 GuCP3 Azul de lactofenol, Tallo. Autoras 2020.	33
Figura 10 GrCA1 Agar Sabouraud, Tallo. Autoras 2020.	34
Figura 11 GrCA1 Azul de lactofenol. Autoras 2020	34
Figura 12 GrCB1 Agar Sabouraud (iz) - PDA (der), Tallo y fruto. Autoras 2020.	34
Figura 13 GrCB1 Azul de lactofenol, fruto. Autoras 2020	34
Figura 14 GrCB2 Azul de lactofenol, Tallo. Autoras 2020	34
Figura 15 GrCB3 Azul de lactofenol, Hojas. Autoras 2020.	35
Figura 16 GuCC1 Agar Sabouraud. Autoras 2020.	35
Figura 17 GuCC1 Azul de lactofenol. Autoras 2020.	35
Figura 18 GuCC2 Agar sabouraud. Autoras 2020	35
Figura 19 GuCC2 Azul de lactofenol. Autoras 2020	35
Figura 20 Gulupa. Autoras 2020.	36
Figura 21 Granadilla. Autoras 2020.	37
Figura 22 Granadilla. Autoras 2020.	37
Figura 23 Gulupa. Autoras 2020.	37
Figura 24 Electroforesis en gel de agarosa para muestras de hongos. Autoras 2020.	38

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Págs.</b>
Tabla 1. Características de las fincas seleccionadas	28
Tabla 2. Master mix PCR para la identificación de microorganismos.	31
Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de la región ITS1-ITS4.	32
Tabla 4. Descripción fenotípica de los hongos aislados	33
Tabla 5. Identificación fenotípica mediante claves dicotómicas (anexo 3)	35
Tabla 6. Pruebas de patogenicidad.	36
Tabla 7. Nuevo aislamiento	38
Tabla 8. Resultados de la secuenciación y análisis de datos.	39



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

**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS CON ACCIÓN FITOPATÓGENA EN  
CULTIVOS DE PASIFLORAS (GULUPA Y GRANADILLA) PROCEDENTES DE  
FINCAS EN CUNDINAMARCA**

**RESUMEN**

La granadilla (*Passiflora ligularis*) y la gulupa (*Passiflora edulis Sims*) son frutos tropicales que pertenecen a la familia de pasifloras y su importancia radica en el incremento del mercado de exportación ocupando el primer y segundo lugar respectivamente de las exportaciones colombianas de pasifloras. El objetivo de este trabajo fue caracterizar hongos fitopatógenos aislados de plantas de gulupa y granadilla enfermas, procedentes de cuatro fincas de Cundinamarca que estaban presentando pérdidas de sus cultivos, contactadas a través de Fedepasifloras. Se realizó identificación fenotípica de un aislamiento inicial de ocho microorganismos fúngicos posiblemente fitopatógenos a los que se les hizo las pruebas de patogenicidad. Cinco de los aislamientos dieron positivos. Con estos 5 hongos se procedió a realizar la identificación genotípica mediante la extracción de ADN, amplificación por PCR a través de primers ITS1 e ITS4, secuenciación y búsqueda en las bases de datos del genbank. Los resultados obtenidos permitieron establecer que los 5 hongos fitopatógenos fueron del género *Fusarium*, cuatro de ellos de la especie *oxysporum* incluyendo una subespecie *Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense* y el quinto *Fusarium* cf.  *incarnatum – equiseti* que son los responsables del problema en las fincas seleccionadas. Se concluyó que el hongo del género

*Fusarium*, sigue siendo el mayor problema fitosanitario en pasifloras. A futuro, será necesario estudiar a *Fusarium* cf. *incarnatum* – *equiseti* especie que se identificó en un trabajo previo del grupo Ceparium en un cultivo de maracuyá en Pacho.

**PALABRAS CLAVE:** *Passifloras*, hongos fitopatógenos, gen ITS (espaciador transcrito interno), *Fusarium*.

Estudiantes: Valentina Henao Bustos y Luisa Fernanda Sandoval Segura

Docente: Ligia Consuelo Sánchez Leal

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Septiembre 2021

## 1. INTRODUCCIÓN

Las pasifloras, también llamadas flor de la pasión comprenden cerca de 360 especies y son plantas de amplia distribución en países tropicales y subtropicales, donde Colombia tiene reportado el mayor número de variedades y cuya producción frutícola es importante a nivel comercial por su gran potencial a nivel nacional e internacional, ya que su fruto de apetecible consumo se ha convertido en el tercero más exportado, casi tanto como el café<sup>20</sup>, por lo que es importante determinar las causas que representen una disminución de la productividad y por ende, una afectación económica. Así pues, el mayor problema fitosanitario de los cultivos, por el clima y nivel de humedad son los microorganismos fúngicos, que se encuentran presentes en un amplio rango de procesos ecosistémicos, ya sea en la descomposición de materia orgánica o como causa de algunas enfermedades de especies vegetales como las pasifloras<sup>14</sup>. Es importante realizar la caracterización de síntomas como la presencia de marchitez y pudriciones, a partir de las cuales se aíslen e identifiquen los posibles hongos fitopatógenos para entender la diversidad, abundancia, riqueza y su actividad en la familia de las pasifloras.

Estos microorganismos perjudiciales conllevan a la afectación de los cultivos ocasionando grandes pérdidas a nivel económico para los agricultores ante la ruina parcial o total de las cosechas, donde algunas fuentes estiman que dicha pérdida está entre el 5 y el 25% en países desarrollados y del 20 al 50% en países en desarrollo<sup>19</sup>; además del aumento en los costos de producción, ya que se tienen que implementar medidas para su control, como el uso de fungicidas que generan diversos problemas relacionados con la inocuidad de los alimentos y un impacto medioambiental negativo<sup>21</sup>.

En el año 2006 la gulupa y granadilla ocuparon el segundo y primer lugar respectivamente de las exportaciones colombianas de pasifloras, de las cuales se han reportado varios hongos necrótrofos, aunque el que ocasiona grandes pérdidas

a nivel económico es el género *Fusarium*. También se ha reportado *Colletotrichum*, *Cladosporium* y *Alternaria*. Todos los órganos de la planta son susceptibles al ataque por fitopatógenos, algunos ingresan por la raíz y otros por tallos, flores y frutos. Causan pudriciones, muerte de los tejidos en los tallos y ramas, el más reportado es marchitez vascular, aborto en órganos florales y afección en la germinación de las semillas que terminan afectando el comercio de las pasifloras<sup>2</sup>.

Teniendo en cuenta estos conceptos, el presente proyecto realizó la caracterización fenotípica y genotípica de los posibles microorganismos fúngicos con capacidad fitopatógena en dos cultivos de pasifloras, gulupa y granadilla, con el fin de identificar los agentes causales de dichas pérdidas para que a partir de esta información se puedan generar estrategias para su control, lo que beneficiaría a la agricultura y la economía relacionada con este tipo de cultivos tan importantes en varias regiones del país. Por medio de Fedepasifloras, se realizó un inventario de fincas en Cundinamarca productoras de estas variedades, para entrar en contacto con cultivadores interesados en conocer sobre su problemática fitosanitaria, y donde se encontraron reportes de pérdidas incluso del 100% de la producción.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Caracterizar hongos fitopatógenos aislados de plantas de gulupa y granadilla, procedentes de cuatro fincas de Cundinamarca.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Seleccionar cuatro fincas en Cundinamarca que presenten enfermedades fúngicas en los cultivos de gulupa y granadilla.
- Verificar la presencia de posibles hongos fitopatógenos aislados de material vegetal de rizósfera y filosfera procedentes de los cultivos de gulupa y granadilla en las fincas seleccionadas.
- Identificar genotípicamente los hongos fitopatógenos aislados de los cultivos de gulupa y granadilla en las fincas seleccionadas.

### 3. ANTECEDENTES

Las pasifloras han presentado desde su comercialización problemas fitosanitarios, los cuales han sido reconocidos por los agricultores a través de sus síntomas. En la actualidad se sabe que existen varios hongos que podrían ser los causantes de este problema.

De acuerdo con Power et al<sup>1</sup> en 1984, se estableció que la fruta de la pasión amarilla puede presentar síntomas conocidos como *dieback*, los cuales incluyen disminución de la elongación de los entrenudos del extremo del brote, lo que lleva a la marchitez y posterior muerte. De los brotes que presentaban síntomas de *dieback*, en Surinam, se aislaron tres hongos, entre los que se encontró *Colletotrichum gloeosporioides*. En los experimentos de inoculación con los hongos, los resultados fueron negativos, ya que al parecer el sistema radicular aún no se había desarrollado. Después de una inoculación en las raíces con plantas de tres meses de edad, se infectaron raíces y partes aéreas. Los investigadores concluyeron que un sistema radicular que presenta síntomas causados por un hongo como *Fusarium solani*, puede predisponer a las plantas a la infección por *C. gloeosporioides*. Es necesario la identificación inicial de los síntomas y diagnóstico presuntivo y definitivo de la enfermedad.

Según Moriwaki et al<sup>4</sup> en 2003, se recogieron 11 aislamientos de una especie de *Colletotrichum* de varias especies de plantas, en la costa del Pacífico de Japón. Aunque el hongo causante de antracnosis en diversas variedades, incluyendo las pasifloras, había sido identificado una vez como *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*, era claramente diferente de *C. gloeosporioides sensu stricto* en sus

amplias conidias, las cuales presentan una base conidial parecida al hilio y colonias de color naranja en el agar PDA. En este trabajo las homologías intraespecíficas, entre los hongos fueron de casi 100%, pero a nivel interespecífico fueron de 80,2% con *C. gloeosporioides*. Basados en la caracterización fenotípica y molecular, los investigadores la proponen como una nueva especie, *Colletotrichum boninense*. Es importante realizar este tipo de caracterizaciones para no confundir los patógenos que se encuentran causando efecto patológico en las plantas.

En cuanto a Contreras<sup>6</sup> en 2006, realizó la caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de lulo, tomate de árbol, granadilla, mango y tallos de mora con síntomas de antracnosis, donde describió cómo se manifiestan macro y microscópicamente las estructuras características del patógeno además de su crecimiento a diferentes temperaturas, sensibilidad al Benomyl y pruebas de proteasa, determinando la presencia de las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, que son consideradas como las más exitosas de los hongos patógenos de plantas de zonas templadas y tropicales. Por otro lado demostró el potencial de infección cruzada entre los aislamientos de clima frío moderado y mango en los tratamientos con heridas y sin heridas implicando la necesidad de estrategias de manejo de los cultivos.

Pérez et al<sup>8</sup> en 2007, llevaron a cabo una revisión de la diversidad de *Passifloraceae* colombianas realizando una biogeografía y una lista actualizada para la conservación, usando 3.930 datos provenientes de la literatura, herbarios, y observaciones de campo, donde *Passiflora* es el género más importante, con 162 especies, cuya distribución y mayor diversidad se concentra en la región andina con 81% de las especies, particularmente en los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca, Cundinamarca, Quindío, Risaralda, y Caldas. El conocimiento de la diversidad del género y de su distribución es necesario para desarrollar su potencial económico y la conservación de los cultivos.

García et al<sup>9</sup> en 2007, diagnosticaron en campo las principales enfermedades y plagas en el cultivo de granadilla (*Passiflora ligularis juss.*) en los municipios de

Garzón, Gigante y Pitalito del departamento del Huila, reportadas como las zonas de mayor producción. De las 5 enfermedades encontradas, 4 fueron consecuencia de hongos como agentes fitopatógenos, secadera por *Fusarium* spp., ojo de pollo por *Phomopsis* spp. roña de los frutos por *Colletotrichum* spp. *Penz.* y moho gris de los botones florales por *Botrytis* spp. Evidenciando a los hongos como un potencial problema fitosanitario que amenaza a uno de los departamentos con mayor producción de pasifloras, causando la pérdida de las principales áreas sembradas.

Fischer et al<sup>10</sup> en 2008, estudiaron las enfermedades de la flor de la pasión (*Passiflora* spp.), realizando una revisión sobre sintomatología, epidemiología y agente causal de etiología viral, bacteriana y fúngica que contribuyen a la reducción de la productividad, reconociendo como las más importantes a la mancha bacteriana, la antracnosis, la pudrición de la raíz y el cuello y la marchitez por *Fusarium*. Estas dos últimas tienen la capacidad de arrasar cultivos enteros al provocar un marchitamiento irreversible y por consiguiente la muerte de la planta. Evidencian la existencia de una gran variedad de fitopatógenos pertenecientes a virus y hongos con un potencial de amenaza devastador para los cultivos de pasifloras.

En cuanto a Molina<sup>13</sup> en 2010, aisló y caracterizó hongos patógenos presentes en lulo, tomate de árbol y mora de castilla potencialmente patógenos para los cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims.). La expansión y concentración de este tipo de cultivos de clima frío moderado favorece la aparición de enfermedades que deterioran la calidad de los frutos, por lo que evaluó el efecto de los principales agentes patógenos del lulo, el tomate y la mora sobre frutos de gulupa de zonas productoras en el departamento de Cundinamarca mediante pruebas de patogenicidad cruzada *in vitro*. Resaltó que *Cladosporium* spp, *Alternaria* spp y *Colletotrichum* spp. son los hongos que se deben tener en cuenta dentro del manejo integrado de especies cultivadas en agroecosistemas similares, pues generaron la aparición de síntomas de enfermedad en la pasiflora.

Sanabria<sup>14</sup> en 2010, realizó un reconocimiento de las enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en el departamento de Boyacá. En este trabajo se identificaron los principales hongos fitosanitarios *Colletotrichum* spp., *Alternaria* sp. y *Cladosporium* sp. aislados de lesiones y síntomas en los principales órganos de la planta que fueron confirmados mediante pruebas de patogenicidad. Así determinaron que dichos hongos eran aislados principalmente de los tallos y hojas de las pasifloras que terminaban afectando a los frutos y describieron la sintomatología de enfermedades tales como mancha parda, antracnosis entre otras, que mantienen una alta incidencia en cultivos monitoreados.

En lo que respecta a Riascos et al<sup>17</sup> en 2011, analizaron la sintomatología de la roña en gulupa (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) mediante un análisis macro y microscópico (histopatología), encontrando diferentes niveles o estados de avance de la enfermedad correlacionados con degradación de tejidos en frutos, hojas y ramas, posiblemente por liberación de toxinas; dicha patología se ha encontrado asociada a *Colletotrichum*. Sin embargo, en este estudio se encontraron estructuras de *Cladosporium* en las lesiones de la enfermedad, y por ende este hongo es el responsable del desarrollo de la patología, y no *Colletotrichum*, dada la ausencia de estructuras como acérvulos que lo comprometan. Su estudio evidencia la importancia de la identificación etiológica de los agentes fitopatógenos y no solo asociar a estos según la sintomatología de la enfermedad.

Ortiz et al<sup>19</sup> en 2013, describen las patologías relacionadas con fusariosis en el cultivo de gulupa en la región del Sumapaz (Colombia), según la descripción y comparación sintomatológica de la presencia de marchitez y pudrición del cuello están asociadas a *F. oxysporum* y *F. solani*, respectivamente. Estos hongos de amplia distribución representan uno de los más grandes problemas fitosanitarios, siendo esencial resaltar la importancia de determinar el posible sinergismo y antagonismo que bacterias aisladas en suelos de las mismas pasifloras puedan ejercer sobre él.

Garzón<sup>22</sup> en 2013, caracterizó e identificó molecularmente hongos de suelo aislados de los páramos de guasca y cruz verde, Cundinamarca - Colombia, con el fin de hacer una adecuada clasificación para determinar su potencial industrial. Se obtuvieron como resultado la identificación fenotípica y genotípica de *Aspergillus* A-26 confirmada como *Aspergillus terreus*, *Aspergillus* 3CV confirmada como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* confirmada como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* confirmada como *Aspergillus tubingensis*, y finalmente *Mucor circinelloides*. Este estudio permite evidenciar cómo el uso de métodos morfológicos como claves taxonómicas encontradas en la literatura y moleculares mediante la amplificación y secuenciación del fragmento de la región Internal Transcribed Spacer (ITS) o del gen de la  $\beta$ -tubulina representa una buena combinación para la adecuada identificación de hongos.

En cuanto a Granobles et al<sup>25</sup> en 2014, la investigación estuvo encaminada hacia la determinación de las dinámicas de las poblaciones de hongos y cómo estos varían frente a diferentes tratamientos. En los resultados se encontró que las poblaciones fúngicas del suelo están involucradas en un amplio rango de procesos ecosistémicos, como la participación en los ciclos biogeoquímicos, descomposición de materia orgánica y en la causa de algunas enfermedades de especies vegetales como *Passiflora edulis*. Los investigadores compararon la diversidad, abundancia y riqueza de hongos del suelo, con una mezcla de *Trichoderma harzianum* - *Bacillus subtilis*, Vinazas y manejo convencional con fertilizantes. *Bacillus subtilis*, presentó actividad antibiótica sobre los hongos patógenos aislados del suelo, confirmándose su actividad como biocontrolador, reflejando la actividad antagónica de las bacterias frente a los hongos que interactúan con la rizosfera de las *pasifloras*.

En lo que respecta a de Oliveira et al<sup>30</sup> en el año 2016 realizaron un estudio donde obtuvieron progenies mediante cruces interespecíficos entre *Passiflora edulis* × *Passiflora mucronata*, además realizaron la evaluación genética de las progenies y seleccionaron genotipos resistentes a *Fusarium solani*. En el cruce recíproco obtuvieron 9 semillas y sólo sobrevivió un genotipo. Debido al reducido número de genotipos obtenidos, propagaron por esquejes 10 genotipos híbridos y sus

progenitores *P. edulis* (susceptible) y *P. mucronata* (resistente). Los investigadores detectaron resistencia al hongo en los genotipos de *P. mucronata*, de Bahía, y en dos genotipos híbridos. Teniendo en cuenta la caracterización genotípica, los autores determinaron que el híbrido resistente puede ser retrocruzado con *P. edulis* y/o utilizado como portainjerto para la fruta de la pasión ácida. Se destacan las bases sobre el cruce entre especies y selección de progenies resistentes a patógenos.

Con relación a la identificación genotípica, se citan a continuación varios trabajos.

Lafuente et al<sup>31</sup> en 2016, identificaron molecularmente hongos fitopatógenos de cultivos de fresa por PCR (ITS y EF-1 $\alpha$ ) y su susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. Fueron caracterizados 14 hongos de manera morfológica dentro de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma*. También la identificación de las especies *A. Niger*, *A. calidoustus*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *M. circinelloides*, *N. fischeri*, *P. menonorum*, *P. pinophilium* y *T. asperellum* mediante PCR con las secuencias ITS y EF-1 $\alpha$ , que se compararon con todas las secuencias nucleotídicas de hongos en la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI) empleando la herramienta BLAST. El artículo expone la necesidad de realizar una caracterización genotípica y el uso de la herramienta BLAST para una completa identificación género-especie de los hongos fitopatógenos aislados.

Salazar et al<sup>32</sup> en 2016, realizaron la caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en Pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). Mediante el uso de PCR con los cebadores ITS1 – ITS4 y TEF1 $\alpha$  que se compararon con los registros del NCBI y se alinearon usando Clustal W2, construyendo relaciones filogenéticas con el programa MEGA 6 y el coeficiente de máxima verosimilitud, obteniendo como resultado el aislamiento de *F. oxysporum* y una especie de *Fusarium* no reportada en el GenBank. La investigación señala métodos de extracción y secuenciación, además de un análisis filogenético

detallado de algunos de los hongos que se encuentra ampliamente presente en los cultivos.

En cuanto a Cruz et al<sup>34</sup> en 2017, identificaron hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México, aislando *Gilbertella persicaria*, *Mucor irregularis* y *Rhizopus oryzae*, los dos últimos reportados por primera vez como causantes de dicha enfermedad en el país. La caracterización molecular se realizó mediante el análisis de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y 28S (LSU) ribosomal y la confirmación de la especie con secuencias del Genbank. Este estudio hace uso de los postulados de Koch, evidenciando la importancia de determinar y confirmar la patogenicidad de las estructuras fúngicas aisladas, además de mencionar otras regiones que se pueden analizar.

Robledo et al<sup>35</sup> en 2017, desarrollaron su investigación en base la observación por microscopía electrónica de barrido ambiental de plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* f. sp. *flavicarpa*) inoculadas con *Fusarium solani* f. sp. *Passiflorae* (agente causal de la pudrición del cuello de la fruta de la pasión). Los investigadores realizaron las inoculaciones cada 24 horas, hasta el séptimo día y hasta el día quince el intervalo fue de 72 horas. Luego aislaron el patógeno en medio PDA y fue inoculado en el cuello de la planta. Los autores realizaron la observación de la epidermis del cuello, el tallo y las hojas y las secciones longitudinales del cuello y el tallo, además de hipertrofia y degradación de la pared celular de los tejidos vasculares. Encontraron que la colonización interna por hifas de *F. solani* f. sp. *Passiflorae* se concentraba en el área del cuello y los daños de las células indican una actividad enzimática extracelular del hongo. El periodo de incubación y latencia de *F. solani* f. sp. *Passiflorae* fue de 1,4 y 4 días, respectivamente. Este estudio no es molecular, pero si utiliza microscopía electrónica, otra forma de conocer la acción o actividad del hongo sobre las diferentes partes de la planta

Martínez et al<sup>37</sup> en 2018, realizaron la estandarización de un sistema de infección con cepas de *Fusarium solani* en plantas de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.),

mediante la producción del inóculo del *hongo* en granos de arroz y papa-dextrosa para luego ser inoculado en la planta y hacer seguimiento de la enfermedad, estimando así una escala de evaluación de síntomas de secadera en las plantas de granadilla de 5 grados de intensidad (0-4) según los síntomas presentados en hojas, tallo y raíces; reconociendo a la secadera como el limitante más importante en el cultivo durante la etapa productiva, el sistema que establecieron permite que se puedan hacer estudios de patogenicidad, evaluar las variantes patogénicas del hongo o la respuesta del hospedero frente al patógeno. Este trabajo se cita por la importancia que tiene comprobar, la infección de *Fusarium*, con bioensayos.

Heno et al<sup>38</sup> en 2018, realizaron la identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia, reconocido como agente causal de grandes pérdidas económicas. Seleccionaron y purificaron ocho aislamientos para realizar la extracción de ADN y amplificación de la región TEF 1 alpha que fueron comparados con las bases de datos del NCBI y del *Fusarium* ID, mediante el programa Mega 6 y el uso del coeficiente de similitud, identificando *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium solani*. Teniendo en cuenta la importancia de *Fusarium* como fitopatógeno en cultivos de pasifloras, en esta investigación se mencionan bases de datos específicas a dicho género.

Según Martínez et al<sup>44</sup> en 2020, describieron a la pasiflora como un grupo de especies de importancia económica en Colombia por su potencial productivo y sus propiedades nutricionales, farmacéuticas e industriales. Por lo anterior los investigadores realizaron la caracterización de la diversidad genética de *Passifloras* spp en el departamento de Boyacá, mediante el uso de marcadores de repetición de secuencias simples (ISSR). En el estudio indicaron una gran diversidad genética, pero sin una estructura poblacional definida. Los resultados sugirieron niveles de jerarquía y subdivisión más finos que los considerados en este estudio, además de una caracterización morfoagronómica complementaria que estableció la diversidad genética total. Esta investigación fue necesaria para estudiar la diversidad genética de las especies cultivadas en los principales departamentos productivos, como Boyacá.

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1 Generalidades de las pasifloras**

El género *Passiflora* comprende más de 600 especies que corresponden a 18 géneros de plantas dicotiledóneas de la familia Passifloraceae, que son especies herbáceas o semileñosas y usualmente presentan zarcillos axilares<sup>27</sup>. El término *passiflora* del latín *passio* (pasión) y *flos* (flores), ha hecho que algunos autores la denominen como la flor de la pasión. Gran parte de las especies agrupadas en esta familia son frutas comestibles y están distribuidas en Norteamérica y Suramérica, la región Caribe, islas Galápagos, África, Asia, Oceanía, Filipinas y Australia, encontrando el mayor número de especies en Colombia, debido a la variedad de hábitats y climas<sup>15</sup>. Algunas pasifloras son importantes por su agradable sabor y aroma, contenido nutricional y propiedades farmacológicas; las hojas contienen alcaloides y las flores de varias especies se cultivan como plantas ornamentales<sup>45</sup>.

#### **4.2 Pasifloras en Colombia**

Colombia es el centro de diversidad de un grupo importante de especies de pasifloras, con una cadena productiva en 24 departamentos y 422 Municipios con más de 15.000 hectáreas de siembra, donde la maracuyá, granadilla y gulupa han adquirido importancia en exportaciones, generando gran cantidad de empleos<sup>46</sup>. Según el ministerio de agricultura y desarrollo rural, en 2017 se identificaron a 5.511 productores en el territorio nacional con una exportación del 3,28% de la producción total que representó un valor de US \$30.095.926<sup>40</sup>. El país cuenta con una producción que cubre lo requerido por la población colombiana, por lo que, pese a su potencial en mercados internacionales, es necesario aumentar el rendimiento de los productos sembrados, lo que implica la generación de investigaciones y conocimientos sobre fitopatógenos que generen pérdidas, entre otros<sup>41</sup>.

#### **4.3 Taxonomía de las pasifloras**

- **Reino:** Plantae
- División:** Magnoliophyta
- Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Malpighiales

**Familia:** *Passifloraceae*

**Género:** *Passiflora*

**Especie:** *Passiflora edulis sims*

*Passiflora ligularis*

#### **4.4 Gulupa (*Passiflora edulis* var. *edulis sims*) y granadilla (*Passiflora ligularis*)**

La gulupa y granadilla son unas de las frutas tropicales que mayor aceptación vienen adquiriendo tanto en los mercados nacionales como internacionales por su aspecto, sabor, y contenido nutricional. La gulupa ocupa el cuarto puesto dentro de los principales productos agrícolas de exportación, cuya distribución zonal se mantiene principalmente en Antioquia quien lidera la producción con 72% de participación seguido por Cundinamarca con 9%, Tolima 8%, Boyacá 3%, y Cauca 2 %<sup>47</sup>. En Colombia la gulupa pasó de exportar USD 21,3 millones en 2015 a USD 33,3 millones en 2019. Por otro lado, la granadilla pasó de exportar USD 3,5 millones en 2015 a USD 5,1 millones en 2019<sup>50</sup>, con principal representatividad de producción en Huila con 50%, Cundinamarca 9.4%, Antioquia 8.8 % y Nariño 5.7% en el 2018<sup>42</sup>.

#### **4.5 Condiciones de cultivo**

En lo que respecta al clima, las pasifloras crecen desde climas cálidos a fríos en regiones tropicales y subtropicales, dentro de altitudes que oscilan entre los 1200-2000 m sobre el nivel del mar. Son sensibles a las heladas severas. El rango de temperaturas entre 21 y 25°C se considera el más favorable para el crecimiento de la planta, siendo el mejor entre 23 y 25°C, pero la fruta de la pasión se cultiva con éxito a temperaturas entre 18°C y 35°C<sup>33</sup>.

Todas las pasifloras requieren una humedad moderada, pero varían en su tolerancia a las temperaturas frescas y tienen en común como se nombró anteriormente, que

solo pueden ser cultivadas comercialmente en sitios libres de heladas. Por otro lado, los suelos apropiados para cultivo de pasifloras como la gulupa, son de textura franco – arenosa, aunque también puede tolerar suelos franco – arcillosos, pero con buen drenaje natural y con un alto contenido de materia orgánica y un pH que debe oscilar en 5.5 a 6.5<sup>12</sup>.

Para establecer el riego en los cultivos de pasifloras, se deben conocer los requerimientos hídricos de la planta y las condiciones de precipitación de la zona donde se va a implementar el cultivo<sup>26</sup>. De esta forma se garantiza que la planta disponga del agua que necesita.

El crecimiento de los frutos de algunas pasifloras comestibles comerciales está alrededor de 90 días en promedio. Para la cosecha, la recolección se lleva a cabo una vez por semana, en las primeras horas del día ya que el fruto presenta mayor frescura y no se expone a la radiación solar. Se realiza de forma manual utilizando tijeras y guantes. Una vez cosechados los frutos se realiza una preselección, donde se separan los frutos afectados por enfermedades, insectos u otros daños fisiológicos o físicos<sup>11</sup>.

#### **4.6 Principales fitopatógenos que afectan a la gulupa y granadilla**

Estudios que identifican fitopatógenos en gulupa han identificado hongos tales como *Colletotrichum* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Septoria* spp. *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, causantes de las enfermedades conocidas como antracnosis, roña, mancha parda, moho gris, fusariosis, marchitamiento vascular y pudrición de la raíz y del tallo<sup>14</sup>.

En granadilla se han identificado *Colletotrichum gloeosporioides* causante de roña de los frutos, *Phomopsis* sp causante de mancha ojo de pollo o quemazón, *Botrytis cinerea* en Moho gris de los botones florales y de las flores, moho café de las flores y los frutos, *Rhizopus stolonifer* en Moho negro de los botones florales<sup>11</sup> y *Fusarium* sp en secadera.

#### **4.7 Pérdidas de cultivos por fitopatógenos en Colombia**

Los problemas fitosanitarios asociados a los cultivos de la familia Passifloraceae son los principales factores implicados en la disminución de la producción, ya que pueden causar pérdidas entre 30-40%<sup>23</sup>. Se pueden presentar pérdidas al momento de la comercialización, dado que los daños generados por las enfermedades obligan a que el producto sea comercializado nacionalmente, perdiendo entre un 30 y 20% de la producción exportable. Según un estudio realizado en la Universidad Nacional de Colombia, en el caso de presentarse un alto nivel de afectación por enfermedades, como por ejemplo las causadas por *Fusarium* spp., en campo, o de Roña en la exportadora, el cultivo presenta un rango de 50/50 de su producción, lo que conlleva a la disminución de los ingresos acumulados en un 31%. Al presentarse una comercialización 40/60 las pérdidas finales de ingresos durante el periodo productivo serán del 25% aproximadamente. Mientras que en una producción 20/80, que posee condiciones controladas y no incurren en mayores costos, la pérdida de ingresos llega de un 10 a 13%<sup>18</sup>. Siendo esta el escenario más recomendable.

#### **4.8 Caracterización de hongos fitopatógenos**

Se conoce que el trabajo de identificación a nivel molecular de hongos filamentosos, constituye una de las tareas más complejas debido a la composición de estos, haciendo de la extracción de ADN uno de los procesos más importantes de los métodos moleculares, en los que se ve involucrada directamente la composición de la pared celular constituida por un 82% de polisacáridos como la quitina, 10% en proteínas y glicoproteínas; seguida de un 8% de lípidos e iones inorgánicos, tales como calcio, fósforo y magnesio, micro elementos fundamentales en la clasificación taxonómica<sup>22</sup>.

Para realizar la caracterización fenotípica de hongos fitopatógenos, se deben llevar a cabo procedimientos que incluyan desde la recogida de muestras hasta el montaje

de pruebas de patogenicidad. Las muestras deben incluir tejidos enfermos y tejidos aparentemente sanos que deben pasar por un proceso de desinfección y posteriormente deben ser cultivadas en medios enriquecidos para el crecimiento de hongos e incubadas a 28°C<sup>43</sup>. Después de observar el crecimiento micelial, se obtienen nuevos aislamientos para la purificación de las colonias. La morfología macroscópica se determina observando las características de las colonias en su parte frontal y trasera, esto ayudará a dar indicios del microorganismo presente. Después de la observación microscópica se facilita la identificación del hongo mediante claves dicotómicas, las cuales son herramientas que permiten la determinación de cualquier categoría taxonómica. Finalmente se utilizan plantas sanas para ser inoculadas con el microorganismo aislado y corroborar que la afección principal está dada por el fitopatógeno obtenido inicialmente. Los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de genes. Tanto para estudios de variabilidad genética como para análisis de regiones conservadas, se han evaluado diferentes marcadores moleculares<sup>28</sup>. Se debe tener en cuenta que la caracterización molecular incluye la extracción de ADN, PCR y electroforesis.

## **5. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **5.1 Universo**

Microorganismos aislados de cultivos de gulupa y granadilla.

### **5.2 Población**

Microorganismos aislados de cultivos de gulupa y granadilla con acción fitopatógica.

### **5.3 Muestra**

Hongos con acción fitopatógica aislados de cultivos de gulupa y granadilla en Cundinamarca de las fincas El Cuate (Gachalá); La Plancha (Gachalá); El Alto (Supatá); Bonanza, (Supatá).

### **5.4 Hipótesis**

Hay una variedad de hongos que pueden afectar los cultivos de pasifloras y en particular las especies de gulupa y granadilla que se cultivan en Cundinamarca y que se han visto afectadas.

### **5.5 Recolección de Muestras**

A través de Fedepasifloras se contactó con las fincas cultivadoras de gulupa y granadilla en Cundinamarca y se seleccionaron las 4 fincas que presentaron mayor afectación fitosanitaria. Las fincas seleccionadas fueron La Plancha, Gachalá cultivadores de gulupa; Bonanza, Supatá cultivadores de granadilla; El Alto, Supatá cultivadores de granadilla, que se caracterizó por encontrarse en un lugar extremadamente húmedo con zonas de encharcamiento que impiden el crecimiento de las plántulas; y El Cuate (propiedad de Ignacio Garzón) ubicada en Gachalá, cultivadores de gulupa. Se realizó la visita según lo acordado con los dueños de las fincas donde se tomaron las muestras de material vegetal enfermo con síntomas como hojas con clorosis, frutos con lesiones por hongos, decaimiento y pérdida en frutos. Finalmente se utilizaron dos neveras de icopor con 14 geles de enfriamiento para el transporte.

Tabla 1. Características de las fincas seleccionadas

<b>Finca</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Observaciones</b>
La Plancha, Gachalá	Gulupa	Delimita un área de 2400 Km <sup>2</sup> , a 1.712 metros sobre el nivel del mar. El clima es templado de 15°C a 20°C. Presenta un terreno inclinado de Suelos franco arenosos Riego por goteo de motobomba (agua de un reservorio)
El Alto, Supatá	Granadilla	Clima templado, suelo de carácter franco arenoso. Lugar extremadamente húmedo con zonas de encharcamiento que impiden el crecimiento de las plántulas
Bonanza, Supatá	Granadilla	Clima templado (18 °C) con suelo de carácter franco arenoso, que generalmente suele tener un tratamiento con <i>Trichoderma</i> spp, Urea, Cloruro de potasio, leche pasteurizada, a una altura de 1.951 metros sobre el nivel del mar. El terreno suele presentar lluvias constantes y suele usarse un sistema de riego por goteo para las condiciones de cultivo.
El Cuate, Gachala	Gulupa	Clima templado 15°C a 20°C, con suelos franco arenosos. Presenta pérdidas del 100% de sus cultivos.



Figura 1 Transporte de muestras, Grupo Ceparium 2020.



Figura 2 El Cuate Gachala - cultivos de gulupa, Grupo Ceparium 2020.



Figura 3 Bonanza, Supatá, Grupo Ceparium 2020.



Figura 4 Bonanza, Supatá - Cultivo de granadilla, Grupo Ceparium 2020.

## 5.6 Aislamiento de microorganismos

- Se desinfectó el material vegetal lavando las muestras (tallos, raíces y frutos) con agua de chorro hasta eliminar el suelo y demás contaminantes por 2 minutos. Posteriormente, se colocó el material en solución de hipoclorito por 2 minutos con agitación permanente, se lavó con abundante agua destilada estéril en un vaso de precipitado y luego en solución de etanol por 2 minutos, también en agitación.
- Se aislaron los microorganismos fúngicos de las muestras desinfectadas mediante cámara húmeda y se sembraron en medios de cultivo agar PDA, Sabouraud, YGC, Rosa de Bengala, V8 e incubaron a 28°C durante 8 días.
- Se realizó aislamiento primario, y se hace resiembra de las colonias predominantes o con características macroscópicas que más se repiten.
- En cuanto a la identificación fenotípica, los hongos aislados se observaron de manera macro y microscópica y se confirmaron por claves dicotómicas para la identificación de su categoría taxonómica.

## 5.7 Pruebas de patogenicidad

Se comprobó la fitopatogenicidad de los hongos aislados, procedentes de los cultivos de gulupa y granadilla en las fincas seleccionadas a través de pruebas de Koch.

- Lavar las muestras de tejido vegetal sano según procedimiento anteriormente mencionado.
- Colocar el posible hongo fitopatógeno en frascos Schott tapa azul que contienen agua destilada estéril, raspando los cultivos del hongo en las cajas, hasta obtener una buena cantidad de biomasa. Homogeneizar y filtrar la suspensión a través de una malla o gasa estéril para eliminar el agar o restos de micelio.
- Sacar de esta biomasa 50uL, 100uL, 200uL y 500uL y pasarlos a tubos que contienen 1 ml de agua destilada estéril. Colocar una gota de la mezcla, en la cámara de Neubauer.
- Hacer el conteo de esporas correspondiente para cada concentración. Una vez estandarizado, tendrán la concentración correspondiente del hongo a utilizar en la prueba de patogenicidad.
- Hacer una herida con bisturí en el tejido sano; colocar 0,5 ml del inóculo y cubrir con una gasa estéril pequeña.
- Colocar fragmentos de los tejidos sanos inoculados con el hongo fitopatógeno en cámara húmeda esterilizada y sellada.
- Colocar en la oscuridad a temperatura ambiente por 8 días.
- Realizar observación microscópica de los hongos. Las estructuras deben corresponder al mismo hongo identificado en el aislamiento inicial

## 5.8 Caracterización Molecular

Una vez seleccionados los microorganismos fitopatógenos mediante pruebas de Koch, se procedió a su preparación para el proceso de extracción de DNA. Los hongos fueron cultivados en caldo Papa-Dextrosa (Anexo 1) durante 8 días a 28°C

en oscuridad. El cultivo fue filtrado al vacío con el equipo KGS-47TF Glass microanalysis holder S/S Support 47mm (ADVANTEC®, Japón) y papel de filtro Whatman® Grado 1 de 11µm de poro (GE Healthcare-Whatman, USA) y los micelios obtenidos fueron almacenados en sobres de papel aluminio estériles a -80°C para su preservación hasta su procesamiento.

### 5.8.1 Extracción de DNA

La extracción del ADN genómico se realizó con el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega USA), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de DNA. (Anexo 2). El método utilizado para romper la pared celular se efectuó mediante el uso de calor con baño maria a 65°C y vortex.

### 5.8.2 Amplificación de la región ITS por PCR

Para realizar las pruebas de PCR se inició realizando una mezcla maestra especificada en la Tabla 2.

Tabla 2. Master mix PCR para la identificación de microorganismos.

Componente	Concentración - Vol final 50uL
OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix	25 uL
Primer ITS1	1 uL
Primer ITS4	1 uL
DNA (10ng/µl)	3.3 uL
Agua desionizada	19.7 uL

En cuanto a los hongos, la amplificación de la región ITS por PCR se realizó utilizando los cebadores ITS1\* 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4\* 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', sintetizados por Macrogen (USA) y la enzima OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer de New England Biolabs

(USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron dos ADN genómicos de *Fusarium oxysporum* para el control positivo de la PCR, el primero proveniente de una muestra de tomate de la Universidad Jorge Tadeo Lozano y el segundo de una muestra de gulupa de Pacho Cundinamarca, confirmados fenotípicamente en proyectos del grupo Ceparium y hacen parte del banco de cepas de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Las condiciones de PCR se especifican en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de la región ITS1-ITS4.

Desnaturalización	94°C, 5 min	
Desnaturalización	94°C, 30 seg	30 ciclos
Anillamiento	55°C, 1 min	
Extensión	68°C, 1 min	
Extensión final	68°C, 5 min	

Los productos de PCR de los hongos, se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, teñido con SYBER SAFE Acid Gel Stain, 10,000X (Biotium, USA), con un voltaje de 110V durante 5 minutos, luego 90V por 30 minutos. El gel se observó con el sistema de documentación Bio-Rad Chemi XRS Gel Documentation System y el Bio-Rad Quantity One® software (Bio-Rad, USA) y el marcador de peso molecular utilizado fue el Hyperladder II (50-2000pb) de Boline (USA).

### 5.8.3 Secuenciación de productos de PCR y análisis de datos

Evidenciadas las bandas en la electroforesis, los productos de PCR se enviaron al servicio de secuenciación de Macrogen-USA (USA). Allí fueron purificados y posteriormente secuenciados por el método Sanger. La edición de las secuencias se realizó con el programa bioinformático gratuito Chromas Lite 2.0 de Technelysium (Australia) y mediante el uso del algoritmo BLASTn (BLAST®, National Library of Medicine, USA) se hizo la comparación de las secuencias resultantes con las bases de datos internacionales.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificación fenotípica

Tabla 4. Descripción fenotípica de los hongos aislados

Código	Características macroscópicas	Características microscópicas
<b>Finca: La Plancha; Gachalá. Gulupa</b>		
GuCP1	Colonia algodonosa y de color gris a pardo	Hifas dematiáceas septadas, conidióforo ramificado y conidias botriosas

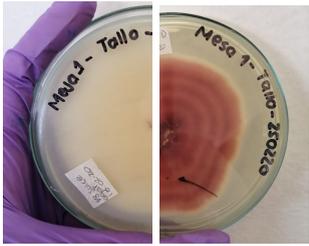
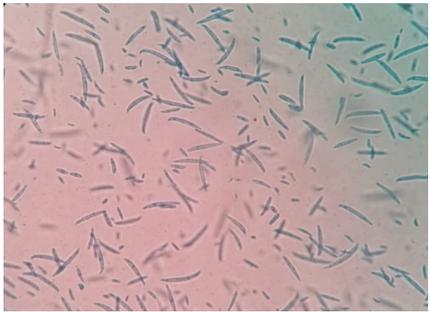
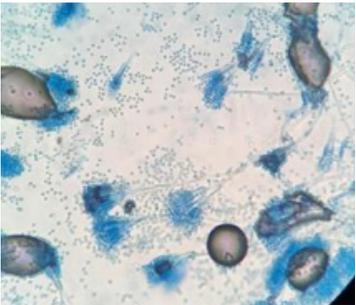
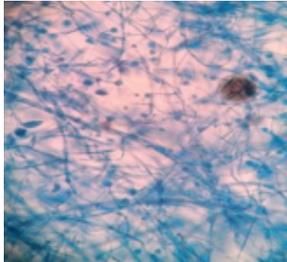
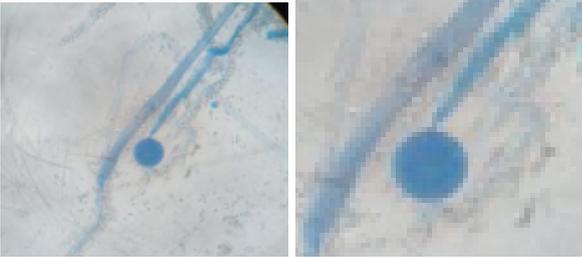
	 <p>Figura 5 GuCP1 Azul de lactofenol, Fruto en agar YGC. Autoras 2020.</p>	
GuCP2	<p>Colonias radiales de color crema, salmón a rosa</p>	<p>Conidios unicelulares hialinos ovoides cilíndricos y ligeramente curvados</p>
	 <p>Figura 6 GuCP2 Agar V8 (iz) - Sabouraud (der), Tallo. Autoras 2020.</p>	 <p>Figura 7 GuCP2 Azul de lactofenol, Tallo. Autoras 2020.</p>
GuCP3	<p>Micelio aéreo, abundante, algodonoso y colonia color blanca</p>	<p>Fragmoconidias en forma de media luna</p>
	 <p>Figura 8 GuCP3 Agar PDA, Tallo. Autoras 2020.</p>	 <p>Figura 9 GuCP3 Azul de lactofenol, Tallo. Autoras 2020.</p>
<p><b>Finca: El Alto; Supatá - Granadilla</b></p>		
GrCA1	<p>Colonias con crecimiento rápido, algodonosas o polvorosas, color gris verdosas y bordes blancos con reverso pálido</p>	<p>Hifas septadas hialinas. Conidióforos ramificados, métulas, fiálides con el vientre cilíndrico estrechándose hacia el ápice y conidias unicelulares redondas catenuladas</p>
		

	Figura 10 GrCA1 Agar Sabouraud, Tallo. Autoras 2020.	Figura 11 GrCA1 Azul de lactofenol. Autoras 2020
<b>Finca: Bonanza; Supatá - Granadilla</b>		
GrCB1	Micelio aéreo, abundante, algodonoso y colonia color blanca y rosada	Hifas septadas con fiálides y fragmoconidias en forma de media luna. Clamidoporas
	 <p>Figura 12 GrCB1 Agar Sabouraud (iz) - PDA (der), Tallo y fruto. Autoras 2020.</p>	 <p>Figura 13 GrCB1 Azul de lactofenol, fruto. Autoras 2020</p>
GrCB2	Colonias con crecimiento rápido, algodonosas, color marrón	Hifas cenocíticas hialinas anchas, esporangio esférico y columela pequeña pero muy ovoide. Ausencia de rizoide
	 <p>Figura 14 GrCB2 Azul de lactofenol, Tallo. Autoras 2020</p>	
		<p style="text-align: center;">Clamidosporas</p>  <p>Figura 15 GrCB3 Azul de lactofenol, Hojas. Autoras 2020.</p>
<b>Finca:El Cuate; Gachala - Gulupa</b>		
GuCC1	Colonia algodonosa de color blanco y en el revés de color blanco	Hifas hialinas septadas, con fragmoconidios en forma de medialunas

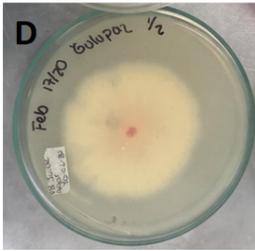
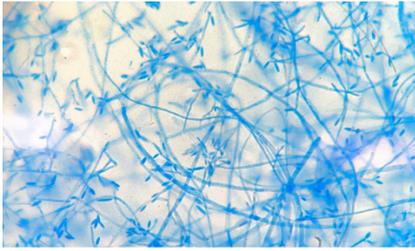
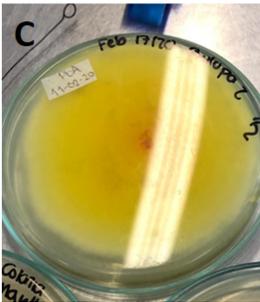
		
	Figura 16 GuCC1 Agar Sabouraud. Autoras 2020.	Figura 17 GuCC1 Azul de lactofenol. Autoras 2020.
GuCC2	Colonia algodonosa de color blanco y en el revés de color amarillo	Hifas hialinas septadas, con fragoconidias en forma de media luna. Presencia de clamidosporas.
		
	Figura 18 GuCC2 Agar sabouraud. Autoras 2020	Figura 19 GuCC2 Azul de lactofenol. Autoras 2020

Tabla 5. Identificación fenotípica mediante claves dicotómicas (anexo 3)

Finca-Cultivo	Código	Ruta: Clave Dicotoma	Clasificación
La Plancha-Gachalá Gulupa 1	GuCP1	1a; 2a; 3a; 4b.	<i>Botrytis</i> sp
	GuCP2	1b; 11a; 12b	<i>Colletotrichum</i> sp
	GuCP3	1a; 2a; 3c	<i>Fusarium</i> sp
El Alto-Supatá Granadilla 1	GrCA1	1b; 3a; 4b; 6b; 7a; 8a; 9a; 10a	<i>Penicillium</i> sp*
Bonanza-Supatá Granadilla 2	GrCB1	1a; 2a; 3b; 6b.	<i>Fusarium</i> sp
	GrCB2	1b; 3a; 4a; 5b	<i>Mucor</i> sp*
El Cuate-Gachalá Gulupa 2	GuCC1	1a; 2a; 3b; 6b.	<i>Fusarium</i> sp
	GuCC2	1a; 2a; 3b; 6b.	<i>Fusarium</i> sp

## 6.2 Pruebas de patogenicidad

La inoculación del material vegetal sano se realizó mediante una jeringa, aplicando 0,5 mL de una solución que contenía  $10^6$  conidios/mL del hongo aislado de cada muestra. Teniendo en cuenta que una prueba de patogenicidad es positiva cuando que el microorganismo inoculado en el hospedero sano, desencadena el mismo cuadro patológico inicial; Las características de los síntomas y los hongos aislados en estas muestras, se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Pruebas de patogenicidad.

Código	Síntomas iniciales	Aislamiento inicial	Prueba de patogenicidad
GuCP1	 <p>Figura 20 Gulupa. Autoras 2020.</p> <p><b>Fruto:</b> Puntos de color negro, manchas de color marron secas y de tamaño variable, moho gris o colonias algodonosas grises y blancas, pudrición y rugosidad</p>	<i>Botrytis</i> sp	Negativa
GuCP2		<i>Colletotrichum</i> sp	Positivo
GuCP3		<p><b>Tallo:</b> Lesiones y manchas.</p> <p><b>Hojas:</b> Clorosis, deformación foliar, manchas color marrón, marchitamiento y defoliación</p>	<i>Fusarium</i> sp
GrCA1	<p><b>Tallo y fruto:</b> Pudrición</p>  <p>Figura 21 Granadilla. Autoras 2020.</p>	<i>Penicillium</i> sp	Negativa. No se observa sintomatología alguna.
GrCB1	<p><b>Fruto:</b> Pudrición y pequeñas colonias algodonosas color blanco a gris</p> <p><b>Hojas:</b> Marchitamiento, pudrición y colonias algodonosas de color blanco a gris</p>	<i>Fusarium</i> sp	<b>Positiva</b>
GrCB2		<i>Mucor</i> sp	<b>Negativa</b>
	<p><b>Tallo:</b> Pudrición</p>		

	 <p>Figura 22 Granadilla. Autoras 2020.</p>		
GuCC1	<p><b>Fruto:</b> Arrugamiento, acompañado de manchas pequeñas de color negro, totalmente seco en su interior y de color amarillo con escaso moho blanco.</p> <p><b>Tallo:</b> Manchas pequeñas de color negro</p> <p><b>Hojas:</b> Completamente secas y con múltiples manchas redondas color negro</p>	<i>Fusarium</i> sp	<p><b>Positivo</b></p> <p>Exterior (sin sintomatología); Interior (moho blanco en las semillas)</p>
GuCC2	 <p>Figura 23 Gulupa. Autoras 2020.</p>	<i>Fusarium</i> sp	<p><b>Positivo</b></p> <p>Exterior (manchas de color negro y arrugamiento); Interior (sin sintomatología evidente)</p>

### 6.3 Identificación molecular

Se realiza recuperación y nuevo aislamiento de los cultivos en Caldo papa dextrosa.

Tabla 7. Nuevo aislamiento

Código	Aislamiento inicial	Aislamiento final
GuCP1	<i>Botrytis</i> sp	No hubo crecimiento
GuCP2	<i>Colletotrichum</i> sp	<i>Colletotrichum</i> sp
GuCP3	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp
GrCA1	<i>Penicillium</i> sp	No hubo crecimiento
GrCB1	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp

GrCB2	<i>Mucor</i> sp	No hubo crecimiento
GuCC1	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp
GuCC2	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium</i> sp

Los productos de PCR de hongos realizados con los cebadores ITS1 e ITS4 se observan claramente en la figura 20.

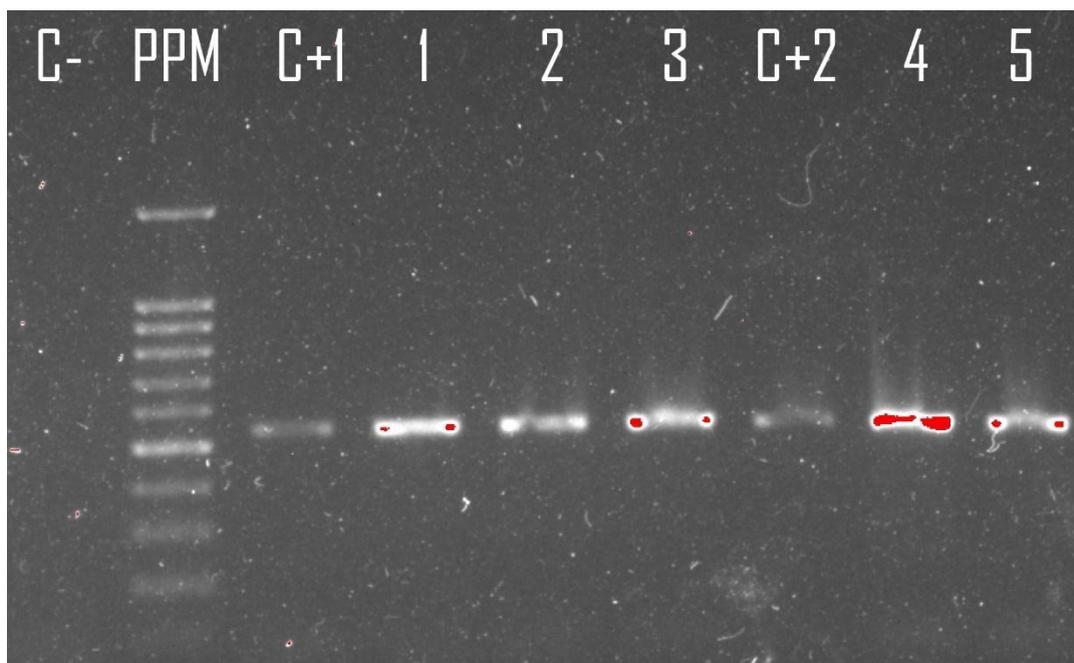


Figura 24 Electroforesis en gel de agarosa para muestras de hongos. Autoras 2021.

C- muestra sin DNA, PPM: Patrón de peso molecular, C+1: Control positivo (DNA *Fusarium oxysporum*), Mx1 (GuCP2), Mx2 (GuCP3), Mx 3 (GuCC1), C+2: Control positivo (DNA *Fusarium oxysporum*), Mx4 (GuCC2), Mx 5 (GrCB1).

#### 6.4 Secuenciación y análisis de datos

Tabla 8. Resultados de la secuenciación y análisis de datos.

Código	Localización	Comparación Blast	Cobertura	Valor E	Identidad (%)	Genbank
C+1	UCMC	<i>Fusarium oxysporum</i>	95%	0.0	99.80%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/MT448901.1">MT448901.1</a>
C+2	UCMC	<i>Fusarium oxysporum</i>	93%	0.0	100%	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/EU839387.1">EU839387.1</a>

GuCP-2	La Plancha, Gachalá	<i>Fusarium cf. incarnatum- equiseti</i>	94%	0.0	100%	<a href="#">MH455291. 1</a>
GuCP-3		<i>Fusarium oxysporum</i>	95%	0.0	100.00%	<a href="#">KY090783.1</a>
GrCB-1	Bonanza, Supatá	<i>Fusarium oxysporum</i>	95%	0.0	100.00%	<a href="#">MT453296.1</a>
GuCC-1	El Cuate, Gachalá	<i>Fusarium oxysporum</i>	96%	0.0	99.80%%	<a href="#">MH151128.1</a>
GuCC-2		<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	93%	0.0	100.00%	<a href="#">MN953004. 1</a>

---

## 7. DISCUSIÓN

Los cultivos de pasifloras pueden manifestar diferentes problemas fitosanitarios a causa de microorganismos fúngicos, los cuales tienden a presentarse más fácilmente cuando no se cuenta con las condiciones de cultivo adecuadas. Teniendo

en cuenta que todas las pasifloras requieren de una humedad moderada la cual varía en su tolerancia a temperaturas frescas y a su vez de un buen drenaje<sup>12</sup>, se encontró que, en las fincas ubicadas en Supatá, zona que se caracteriza por presentar lluvias constantes que generan zonas de encharcamiento, al no ser controladas, no solo impiden o dificultan el crecimiento de las plántulas como lo que manifiesta el agricultor en la finca el Alto, sino que además se ha demostrado que una prolongada y alta humedad relativa aumenta la susceptibilidad a enfermedades foliares y de frutos al favorecer la esporulación e inducir la proliferación de hongos<sup>14</sup>, microorganismos que finalmente pueden terminar causando la pérdida del 100% de los cultivos como en el caso de fincas como El Cuate Gachalá.

En las muestras de gulupa (*Passiflora edulis* var. *edulis* sims) pertenecientes a la finca La Plancha-Gachalá, se aísla una colonia GuCP2 que se catalogó fenotípicamente como *Colletotrichum* sp. Al observarse sus características microscópicas, conidios hialinos cilíndricos ligeramente curvados, y, macroscópicas, colonias de crecimiento radial de color salmón que permitieron su clasificación, no son diagnósticas, por lo que es importante considerar que dichas propiedades morfológicas de las colonias y las conidias pueden tener una considerable variación debido a las condiciones ambientales o de incubación que hace difícil su clasificación mediante métodos tradicionales<sup>36</sup>, específicamente por las similitudes que puede presentar con el género *Fusarium* sp,. Queda comprobado, específicamente teniendo en cuenta los resultados previos por observación microscópica que para un diagnóstico correcto, es indispensable del uso de métodos moleculares para una correcta caracterización, más cuando estos dos géneros exhiben una importante prevalencia causando *Colletotrichum* sp antracnosis, desarrollada en temporadas de lluvia principalmente afectando todos los órganos aéreos de la planta, ocasionando una severa defoliación de la misma, marchitez de las ramas y en los frutos lesiones ligeramente hundidas secas de color café claro y pudrición, y sobre estas pequeños puntos de color negro<sup>14</sup>; *Fusarium* sp por su parte, produce fusariosis con frutos arrugados, clorosis en las hojas y pudrición<sup>19</sup>.

Gracias a la identificación genotípica se determinó finalmente que el fitopatógeno en cuestión no es *Colletotrichum* sp como se indicó inicialmente, sino *Fusarium cf. incarnatum-equiseti*, el cual es un complejo de especies causantes de pudrición en frutos de melón en Brasil generando lesiones que se caracterizan por pequeñas áreas hundidas, seguidas de un intenso crecimiento micelial algodonoso, generalmente de color blanco; también en las hojas de variedad de frutas como la fresa y el lulo. Pero, también se ha encontrado en frutos de otra pasiflora, la maracuyá<sup>38</sup>. Es de relevancia manifestar en esta discusión, que uno de los trabajos previos realizados por el grupo Ceparium encontró *Fusarium cf. incarnatum*. En este trabajo, se hizo el aislamiento de un cultivo de maracuyá de Pacho, Cundinamarca, así que los resultados obtenidos en este proyecto son relevantes, pues por primera vez, se está reportando este microorganismo en gulupa. Es de resaltar, también, que de la misma muestra de esa finca se aisló el microorganismo GuCP3, identificado fenotípicamente como *Fusarium*, al presentar propiedades microscópicas, fragmoconidias en forma de media luna, y macroscópicas más afín con el género, e identificado y comprobado genéticamente como *Fusarium oxysporum*; por lo que una idea inicial en la que los cultivos presentaban afectación de dos géneros diferentes, culmina en la presencia de dos especies fitopatógenas diferentes del mismo género causando el daño.

Adicionalmente, analizando lo encontrado en el cultivo de gulupa de la finca el Cuate ubicada en Gachalá, donde se aislaron dos microorganismos fúngicos con características microscópicas compatibles con *Fusarium* sp pero con características macroscópicas diferentes, en la observación de las pruebas de patogenicidad el patrón de daño en el fruto con los dos microorganismos no fue el mismo. La gulupa inoculada con la colonia amarilla (código GuCC2) se había ablandado y se observaron parches oscuros en su exterior, en el sitio de inoculación se podía observar escasa presencia de hifas aéreas color blanco; sin embargo, en su interior no se observó ninguna alteración. Por otro lado, la gulupa que fue inoculada con la colonia blanca (código GuCC1), no presentó ninguna alteración en su exterior, pero al momento de abrirla se observó que el hongo había invadido varias de las semillas y el conteo de esporas fue mayor que con la cepa anterior. En las pruebas

moleculares se halló que ambos hongos pertenecen a la especie *Fusarium oxysporum*, sin embargo, las diferencias antes mencionadas pueden deberse a la variación de subespecie donde una de estas se identificó como *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*.

*Fusarium oxysporum f. sp. cubense* que corresponde a la colonia amarilla GuCC2 y que presentó menor patogenicidad, se ha reportado como altamente virulento en cultivos de banano, causando obstrucción de los conductos xilemáticos de la planta y posteriormente la muerte de la misma. Sin embargo, no se ha encontrado dicha subespecie del hongo asociado al cultivo en estudio, lo que hace que los resultados de esta investigación sean un nuevo aporte al conocimiento de la patogénia para este cultivo y para la subespecie del hongo, *F. oxysporum f. sp. cubense*. Por otro lado, y recalando lo investigado por Torres, para esta especie (*F. oxysporum*) “las variaciones en la patogenicidad son poco frecuentes y consisten principalmente en la pérdida o en la disminución de la virulencia y, muy rara vez, en el aumento de esa virulencia”<sup>3</sup>. Mientras que la colonia GuCC1 identificado de forma molecular como *Fusarium oxysporum* que presentó un patrón de daño severo y conteo de esporas mayor, y se ha reportado como un hongo devastador en plantaciones de especies comerciales del género *Passiflora* en especial *Passiflora edulis* Sims<sup>29</sup> según Forero et al. Cabe señalar, que esta finca presentó 100% de pérdidas en sus cultivos posiblemente por la capacidad patogénica de ambos *Fusarium* y el probable sinergismo que están presentando.

La finca Bonanza del municipio de Supatá, cultivadores de granadilla nos aportaron información acerca de los métodos de fertilización y cuidados de la tierra, entre los cuales vale la pena recalcar el tratamiento que han estado llevando con el microorganismo *Trichoderma* sp conocido por su acción antagónica sobre algunos fitopatógenos, mediante la producción de enzimas hidrolíticas: quitinasas y glucanasas<sup>5</sup>. A pesar del uso de tratamientos la finca sigue presentando pérdidas en su cultivo, lo que puede deberse a que la concentración de *Trichoderma* sp no es la adecuada o que el o los fitopatógenos estén presentando algún tipo de resistencia frente a este biocontrolador. Al realizar la caracterización fenotípica se aislaron

*Fusarium* sp y *Mucor* sp, además, microscópicamente se observaron clamidosporas, estructuras de resistencia producidas por *Fusarium* sp que tienen la capacidad de sobrevivir inactivas en el suelo durante varios años<sup>24</sup>. Las pruebas de patogenicidad dieron positivas para *Fusarium* sp pero negativas para *Mucor* sp, sin embargo, en el trabajo realizado por Hurtado<sup>48</sup> en el que se aislaron 238 hongos endófitos de *Passiflora edulis* Sims a partir de hojas, tallos, raíz, fruto, flor y semillas, y los reportes de Oliveira et al y Silva et al, indican la posibilidad de que se encontrara a *Mucor* sp como agente endófito en *Passiflora ligularis* (granadilla).<sup>7</sup> A futuro, sería importante poder realizar estudios sobre el posible papel que *Mucor* sp jugaría en procesos de patogenia, resistencia o control natural.

Finalmente, las pruebas moleculares identifican a *Fusarium oxysporum* como el fitopatógeno del cultivo de granadilla donde la enfermedad puede presentarse desde la etapa de semillero, hasta etapas más productivas. En plantas adultas, es evidente el marchitamiento y la clorosis gradual de las hojas que se manifiesta en forma ascendente; posteriormente, esas hojas y el tallo se van secando hasta producir la muerte de la planta, como se observó en las muestras obtenidas de la finca, que se encontraban en absoluta pudrición.<sup>16</sup>

En la finca el Alto ubicada en Supatá productora de granadilla, se aisló *Penicillium* sp en donde las pruebas de patogenicidad dieron negativas, pues no se presentó ninguna sintomatología en la fruta, posiblemente debido a que el microorganismo fue aislado inicialmente en tallo y la prueba se realizó en fruta. Por otro lado, puede deberse a un error en el aislamiento, al no escoger la colonia fitopatógena causante de la sintomatología, sino un hongo contaminante. Además, en la literatura no se ha reportado a *Penicillium* sp como un fitopatógeno en las diferentes variedades de pasifloras. Por otro lado, el hallazgo de dicho hongo no se debe pasar desapercibido, ya que se han encontrado especies de *Penicillium* como hongos necrotrofos patógenos postcosecha en frutos cítricos durante el almacenamiento y comercialización, causando entre 5 y 10% de pérdidas de la producción, al producir la enfermedad conocida como la podredumbre verde, que infecta a través de heridas preexistentes en la piel del fruto según Sierra<sup>39</sup>. Al encontrar *Penicillium* sp

en el presente proyecto como hongo no fitopatológico, se pensaría que aprovechó las heridas causadas por el microorganismo que causa enfermedad y se alojó como hongo contaminante.

Dentro de las enfermedades que afectan a la gulupa, se encuentra el moho gris causado por *Botrytis cinérea*; su presencia se debe en gran medida a las condiciones de humedad relativa y precipitaciones altas<sup>14</sup>. El síntoma más evidente que se ha reportado es el crecimiento abundante de moho en diferentes partes de la planta, además de parches de color gris a marrón con aspecto velludo. Sin embargo, los síntomas que presentaban las muestras no son compatibles con la sintomatología inicial, por lo que dada la prueba de patogenicidad negativa se considera a GuCP1 fenotípicamente identificado como *Botrytis* sp como un agente patógeno, pero no causante de enfermedad en los cultivos de gulupa de la finca la Plancha en Gachalá.

## 8. CONCLUSIONES

- Las condiciones abióticas presentes en las fincas, contribuyen a la susceptibilidad de los cultivos para presentar enfermedades fúngicas especialmente Fusariosis.
- Las 4 fincas de Cundinamarca objetos de este estudio, pese a la distancia, están siendo afectadas por distintas especies, todas pertenecientes al género *Fusarium* donde se resalta la presencia de la especie *F. oxysporum* como la más prevalente.
- Diferentes especies y subespecies de *Fusarium* se encuentran causando enfermedad en un mismo cultivo como *Fusarium oxysporum* y *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* en el cultivo de Gulupa de la finca el Cuate, y *Fusarium oxysporum* y *Fusarium cf. incarnatum-equiseti* en la finca la Plancha Gachalá.
- En el aislamiento, mediante caracterización fenotípica se identificaron géneros de hongos diferentes a *Fusarium*, los cuales dieron negativos en las pruebas de patogenicidad, lo que puede deberse a que son hongos endófitos o exófitos saprófitos, en estas variedades vegetales, que pueden ser oportunistas, pero no necesariamente patógenos para ese cultivo en particular.

## 9. RECOMENDACIONES

- Se presenta por primera vez en cultivo de gulupa, en Cundinamarca, reportado el hongo *Fusarium cf. incarnatum-equiseti*. Su caracterización abre las puertas para continuar la investigación en torno a los procesos de patogenicidad en pasifloras.
- Se sugiere realizar pruebas antagónicas y de control biológico en invernadero y en campo, de los microorganismos fitopatógenos aislados y microorganismos que según la literatura tienen capacidad antagónica contra *Fusarium*, para identificar métodos amigables con el medio ambiente que sean precisos para que los agricultores puedan llevar a cabo el control y disminución de pérdidas de los cultivos.
- Desarrollar pruebas de sinergismo o co-cultivos como opción para explorar varias especies con posible actividad observando las variaciones que puedan existir frente a las diferentes especies y subespecies. Esto sería de gran relevancia teniendo en cuenta lo que vienen realizando en la finca Bonanza Supatá, quienes ya manejan tratamiento con *Trichoderma* el cual, ya sea por la concentración o resistencia no parece haber tenido un efecto benéfico sobre la especie de *Fusarium* aislada.

## REFERENCIAS

1. Power RH, Verhoeff K. Dieback of Passion Fruit in Surinam. J Phytopathol. 1984;110(4):336–45. Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE844U798>
2. Torres C, Sanchez M, Bravo N, Marmolejo de la Torre F GE. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de maracuyá.pdf [Internet]. 1998. p. 27. Disponible en: [http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6418/1/Enfermedadesfungosas\\_y\\_bacterianas\\_en\\_el\\_cultivo\\_de\\_maracuya.pdf](http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6418/1/Enfermedadesfungosas_y_bacterianas_en_el_cultivo_de_maracuya.pdf)

3. Torres GA. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agron Colomb*. 2000;17(1–3):11–6. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/34305>
4. Moriwaki J, Sato T, Tsukiboshi T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience*. 2003;44(1):47–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1340354003706196>
5. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R, Ochoa-Moreno ME. PRODUCCIÓN Y EFECTO ANTAGÓNICO DE QUITINASAS Y GLUCANASAS POR *Trichoderma* spp, EN LA INHIBICIÓN DE *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* IN VITRO. 2005;11(2):273–8. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getattachment/ee408b8b-fd44-4cca-bf0b-44b6c34972e9/-%0A>
6. Contreras CA. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt) granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) mango (*Mangifera indica* L) y tall. 2006;115. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8253>
7. Silva, L. J., Oliveira Silva, R. L. de, Barbosa da Silveira, E., & Tiburcio Cavalcante, U. M. Atividade Enzimática De Fungos Endofíticos E Efeito Na Promoção Do Crescimento De Mudas De Maracujazeiro-Amarelo Enzymatic Activity of Endophytic Fungi and Effect of Growth Promotion of Yellow Passion. 2006;128–34. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=237117566005%250AComo>
8. Pérez JO, Coppens G, Restrepo M, Jarvis A, Salazar M, Cauca V. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for

- conservation. *Biota Colomb.* 2007;8(1):1–45. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/304540942\\_Diversity\\_of\\_Colombia\\_Passifloraceae\\_biogeography\\_and\\_um\\_update\\_list\\_for\\_conservation](https://www.researchgate.net/publication/304540942_Diversity_of_Colombia_Passifloraceae_biogeography_and_um_update_list_for_conservation)
9. García J, Chamorro L, Floriano J, Vera L, Dimas J. ENFERMEDADES Y PLAGAS EN EL CULTIVO DE GRANADILLA (*Passiflora ligularis*) EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA. 2007. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/304540942\\_Diversity\\_of\\_Colombia\\_Passifloraceae\\_biogeography\\_and\\_um\\_update\\_list\\_for\\_conservation](https://www.researchgate.net/publication/304540942_Diversity_of_Colombia_Passifloraceae_biogeography_and_um_update_list_for_conservation)
10. Fischer I, Rezende J. Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). *Pest Technol.* 2008;2(1):1–19. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/228483390\\_Diseases\\_of\\_Passion\\_flower\\_Passiflora\\_spp](https://www.researchgate.net/publication/228483390_Diseases_of_Passion_flower_Passiflora_spp)
11. Miranda D, Fischer G, Carranza C, Magnitskiy S, Casierra F, Piedrahita W, et al. Cultivo poscosecha y comercialización de pasifloráceas en Colombia. Vol. 53, *Sociedad Colombiana de ciencias hortícolas*. 2009. 359 p. 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>
12. Fischer G. Condiciones ambientales que afectan el crecimiento, desarrollo y calidad de las pasifloráceas. *Memorias Prim Congr Latinoam Passiflora*. 2010;10–22. Disponible en: [http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca\\_140\\_Condiciones\\_ambientales.pdf](http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_140_Condiciones_ambientales.pdf)
13. Molina J. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS PRESENTES EN LULO, TOMATE DE ÁRBOL Y MORA DE CASTILLA POTENCIALMENTE PATÓGENOS PARA LOS CULTIVOS DE GULUPA (*Passiflora edulis* var. *edulis sims.*). 2010. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8661>

14. Sanabria Rodríguez NM. Reconocimiento de enfermedades en gulupa. 2010;44. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8664/tesis617.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
15. Perea Dallos M, Fischer G, Miranda D. Passifloraceae, Passifloras Maracuyá, Granadilla, Curuba, Gulupa. 2010;(January):350–90. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/257765541\\_Passifloraceae\\_Passifloras\\_Maracuya\\_Granadilla\\_Curuba\\_Gulupa/link/02e7e525d4399ea9fd000000/download](https://www.researchgate.net/publication/257765541_Passifloraceae_Passifloras_Maracuya_Granadilla_Curuba_Gulupa/link/02e7e525d4399ea9fd000000/download)
16. MANEJO FITOSANITARIO DEL CULTIVO DE LA GRANADILLA [Internet]. Journal of Chemical Information and Modeling. 2011. p. 38. Disponible en: [http://fedepasifloras.org/es/wp-content/uploads/2018/04/CARTILLA-FINAL\\_2015.pdf#:~:text=](http://fedepasifloras.org/es/wp-content/uploads/2018/04/CARTILLA-FINAL_2015.pdf#:~:text=)
17. Riascos D, Quiroga I, Hoyos-Carvajal L. ANÁLISIS DE LA SINTOMATOLOGÍA DE LA ROÑA EN GULUPA (*Passiflora edulis f. edulis SIMS*). Agronomía. 2011;19(1):20–30. Disponible en: [http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia19\(1\)\\_3.pdf.pdf](http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia19(1)_3.pdf.pdf)
18. Montoya E. Evaluación del impacto económico de las principales enfermedades que afectan el cultivo de Gulupa (*passiflora edulis sims.*). 2012;61. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9840/>
19. Ortiz C. E, Hoyos C. LM. Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis Sims.*) en la región del Sumapaz (Colombia). Rev Colomb Ciencias Hortícolas. 2013;6(1):110–6. Disponible en: [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias\\_hortícolas/article/view/1277](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/1277)

20. OCAMPO J. Diversidad y distribución de las Passifloraceae en el departamento del Huila en Colombia. *Acta biol. Colomb.* 2013;18(3):511-516. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X201300300010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X201300300010)
21. Bastidas DA, Guerrero JA, Wyckhuys K. Pesticide residues in passifloras crops in regions of high production in Colombia. *Rev Colomb Química.* 2013;42(2):39–47. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-2804201300200005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-2804201300200005)
22. Garzón N. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS DE SUELO AISLADOS DE LOS PÁRAMOS DE GUASCA Y CRUZ VERDE, CUNDINAMARCA - COLOMBIA [Internet]. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA; 2013. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/14584/GarzonGrajalesNatalia2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
23. Bastidas DA, Jairo A. Guerrero KW. RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN CULTIVOS DE PASIFLORAS EN REGIONES DE ALTA PRODUCCIÓN EN COLOMBIA. *REV COLOMB QUIM* [Internet]. 2013;42(2):57–71. Disponible en: <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>
24. Pinzón Gutiérrez YA, Bustamante SL, Buitrago Hurtado G. Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp). *Rev Colomb Biotecnol* [Internet]. 2013;15(1):52–60. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n1/v15n1a6.pdf>
25. Granobles ÓA, Torres G C. Efecto de Biocontroladores Sobre la Dinámica Poblacional de Hongos de Suelo en un Cultivo de Maracuyá (*Passiflora*

*Edulis Sims Var. Flavicarpa*). Rev Ciencias. 2014;17(2):151–62. Disponible en:

[https://revistas.univalle.edu.co/index.php/revista\\_de\\_ciencias/%20article%20view%20/492](https://revistas.univalle.edu.co/index.php/revista_de_ciencias/%20article%20view%20/492)

26. ASISTENCIA TÉCNICA GREMIAL EN PASSIFLORA HUILA • CAUCA • META [Internet]. Journal of Chemical Information and Modeling. 2015; 38. Disponible en:

[http://fedepasifloras.org/es/wp-content/uploads/2018/04/CARTILLA-FINAL\\_2015.pdf#:~:text=](http://fedepasifloras.org/es/wp-content/uploads/2018/04/CARTILLA-FINAL_2015.pdf#:~:text=)

27. Macgayver M, Morales B, Carolina A, Morales A, Manuel O, Varela A. Morfología de Passiflora: una guía para la descripción de sus especies Passiflora morphology: a guide for the description of species Morfologia da Passiflora: Uma Guia para a descrição de espécies. 2015:6-1. Disponible en:

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1266>

28. Beltran NM, Rincón López JD. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS POR PCR (ITS1 e ITS4), ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL AGUACATE (*Persea americana*) EN EL DEPARTAMENTO DE RISARALDA. 2015;1–17. Disponible en:

[http://media.utp.edu.co/vicerrectoria-de-investigaciones/archivos/PONENCIA\\_-\\_CARACTERIZACION\\_MICROBIOLÓGICA\\_Y\\_MOLECULAR\\_DE\\_HONGOS\\_FITOPATÓGENOS.pdf](http://media.utp.edu.co/vicerrectoria-de-investigaciones/archivos/PONENCIA_-_CARACTERIZACION_MICROBIOLÓGICA_Y_MOLECULAR_DE_HONGOS_FITOPATÓGENOS.pdf)

29. FORERO R, EMIRO O, DE LEÓN W, GOMEZ JC, HOYOS L. Análisis de la resistencia a *Fusarium oxysporum* en plantas de *Passiflora maliformis* L. 2015;9(2):12. Disponible en:

[https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias\\_hortícolas/article/view/4174/pdf](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/4174/pdf)

30. de Oliveira Freitas JC, Viana AP, Santos EA, Paiva CL, de Lima e Silva FH, do Amaral AT, et al. Resistance to *Fusarium solani* and characterization of hybrids from the cross between *P. mucronata* and *P. edulis*. *Euphytica*. 2016;208(3):493–507. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-015-1588-8>
31. Lafuente DF, Barboza JE, Salcedo Rb, Abraham Rb, Valadez J.A, Quistián D, et al. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE FRESA POR PCR ( ITS Y EF-1  $\alpha$  ) Y SUSCEPTIBILIDAD A BACTERIOCINAS DE *Bacillus thuringiensis* INTRODUCCIÓN La producción de Fresa se ha visto comprometida por contaminaciones microbianas causantes de enfer. 2016;1(1). Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/3/72.pdf>
32. Salazar C, Serna L, Gómez E. Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agron Mesoam*. 2016;27(2):277. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/437/43745945006.pdf>
33. Othman N. Cultivation of passion fruit under local climatic conditions of Lebanon (Ghazir) [Online]. LEBANESE UNIVERSITY; 2016. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/322831773\\_cultivation\\_of\\_passion\\_fruit\\_Passiflora\\_edulis\\_under\\_local\\_climatic\\_conditions\\_of\\_Lebanon\\_Ghazir/link/5a71d04baca272e425ee6ee8/download](https://www.researchgate.net/publication/322831773_cultivation_of_passion_fruit_Passiflora_edulis_under_local_climatic_conditions_of_Lebanon_Ghazir/link/5a71d04baca272e425ee6ee8/download)
34. Cruz I, Márquez I, García RS, Carrillo JA, León J, Allende R. Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) en México. *Rev Mex Fitopatol Mex J Phytopathol*. 2017;35(3):397–417. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-3309201700300397](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-3309201700300397)

35. Robledo-Buriticá J, Ángel-García C, Castaño-Zapata J. Environmental Scanning Electron Microscopy of the Infection Process of *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae* in Seedlings of Passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas, Físicas y Nat. 2017;41(159):213. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0370-39082017000200213&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0370-39082017000200213&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
36. Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R. Situación actual de *Colletotrichums* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. Rev Mex Fitopatol Mex J Phytopathol [Internet]. 2017;35(3):549–70. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v35n3/2007-8080-rmfi-35-03-00549-en.pdf>
37. Martínez E, Osorio J, Hio J, Aguirre J, Vergara J, Luque N RE. Estandarización de un sistema de infección con cepas de *Fusarium solani* en plantas de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.). 2018;75. Disponible en: [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/35635/IMPOP\\_2018-2813\\_Póster\\_Erika\\_Martínez\\_V2.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/35635/IMPOP_2018-2813_Póster_Erika_Martínez_V2.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
38. Henao-Henao ED, Hernandez-Medina CA, Salazar-González C, Velasco-Belalcazar ML, Gómez-López ED. Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia. Agron Mesoam. 2018;29(1):53. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v29n1/1659-1321-am-29-01-00056.pdf>
39. Sierra BB. Estudio del mecanismo de acción de proteínas antifúngicas en *Penicillium digitatum* mediante análisis transcriptómico [Internet]. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA; 2018. Disponible en: <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/107707/BOLÓS - Estudio del mecanismo de acción de proteínas antifúngicas en Penicillium digitatum median....pdf?sequence=1&isAllowed=y>

40. González, X. La producción de pasifloras este año en Colombia llegaría a 241.393 toneladas según el gremio. [Internet] Agronegocios.co. 2018 Disponible en: <https://www.agronegocios.co/agricultura/la-produccion-de-pasifloras-este-ano-en-colombia-llegaria-a-241393-toneladas-segun-el-gremio-2795199>.
41. Agronet.gov.co. Pasifloras cifra sectoriales. [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.
42. Giraldo Zuluaga DM, Granados Perez W . Indicadores e Instrumentos Mayo - Junio 2018 Indicadores Generales. Minist Agric. 2018;20. Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2018-05-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
43. Martínez E, Torres C, Díaz JE. Identification of Phytopathogenic Fungi in Cultivars of the Heliconiaceae Family. Rev Ciencias. 2018;21(2):105. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0121-19352017000200101&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-19352017000200101&lng=pt&nrm=iso)
44. Martínez MA, Morillo AC, Reyes-Ardila W. Characterization of the genetic diversity in Passiflora spp. in the Boyacá department, Colombia. Chil J Agric Res. 2020;80(3):342–51. Available from: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-58392020000300342&script=sci\\_arttext&tlng=e](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-58392020000300342&script=sci_arttext&tlng=e)
45. Matamoros Cuervo AP. Diversidad y usos de pasifloras Passifloraceae silvestres y cultivadas en el departamento del Casanare , Orinoquía colombiana. 2020. Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1086&context=biologia>

46. Finagro. Colombia será anfitrión del Congreso mundial de pasifloras el próximo año | Finagro. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.finagro.com.co/noticias/colombia-ser%C3%A1-anfitri%C3%B3n-del-congreso-mundial-de-pasifloras-el-pr%C3%B3ximo-a%C3%B1o>
47. Estrada, C. Colombia exporta en promedio US\$75 millones al año de la fruta exótica gulupa. [Internet]. 2020. Agronegocios.co. Disponible en: <https://www.agronegocios.co/agricultura/colombia-exporta-en-promedio-us75-millones-al-ano-de-la-fruta-exotica-gulupa-2975537>
48. Hurtado S. Aislamiento de endófitos en gulupa (*Passiflora edulis* Sims f.) y su potencial para promoción de crecimiento de la planta y control del Fitopatógeno *Fusarium oxysporum* [Internet]. 2020. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/79386/1032436500.2020.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
49. Oliveira JADS, Polli AD, Polonio JC, Orlandelli RC, Conte H, Azevedo JL, et al. Bioprospection and molecular phylogeny of culturable endophytic fungi associated with yellow passion fruit. Acta Sci - Biol Sci [Internet]. 2020;42:1–11. Available from: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/48321/751375150228>
50. Fonnegra, A. Pasifloras: Una alternativa de producción para Colombia - ANEIA - Universidad de Los Andes. [Internet] ANEIA - Universidad de Los Andes. 2021. Disponible en: <https://agronegocios.uniandes.edu.co/2021/02/03/pasifloras-una-alternativa-de-produccion-para-colombia/>

## **ANEXOS**

### **Anexo 1:** Preparación caldo Papa Dextrosa.

Se preparó en el Laboratorio Central de la UCMC el caldo Papa Dextrosa; se utilizaron 200 g de papa sabanera sin cáscara en 1 litro de agua destilada, la infusión hirvió por 20 minutos, luego se filtró a través de una gasa y se agregó 20 g de Dextrosa, la mezcla resultante se sirvió en matraz pequeños cada uno con 20 ml de caldo aproximadamente, para su posterior esterilización a 121°C por 15 minutos.

### **Anexo 2:** Protocolo kit de extracción.

Para el aislamiento de ADN genómico de hongos se empleó el protocolo del kit Wizard Genomic DNA purification.

1. Añadir 1mL de agua desionizada a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contiene la muestra.
2. Centrifugar a 13.000-16.000 xg durante 2 minutos. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender bien las células en 293  $\mu$ L de EDTA 50mM.
4. Añadir 7.5  $\mu$ L de 75 unidades/ $\mu$ L de lisosima y pipetear suavemente 4 veces para mezclar.
5. Centrifugar la muestra a 13.000-16000 xg durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante.
6. Añadir 300  $\mu$ L de solución de lisis nuclear al pellet de células y pipetear suavemente para mezclar.
7. Añadir 100  $\mu$ L de solución de precipitación de proteínas y agitar enérgicamente a alta velocidad durante 20 minutos.
8. Dejar reposar la muestra en hielo durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 13.000-16.000 xg durante 3 minutos.
10. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL que contenga 300  $\mu$ L de isopropanol a temperatura ambiente.

11. Mezclar nuevamente por inversión hasta que las hebras de ADN formen una masa visible.
12. Centrifugar la muestra a 13.000-16000 xg durante 2 minutos.
13. Decantar cuidadosamente el sobrenadante y escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio. Añadir 300 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente e invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el pellet de ADN.
14. Centrifugar la muestra a 13.000-16000 xg durante 2 minutos. Aspirar cuidadosamente todo el etanol.
15. Escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio y dejar que el pellet se seque al aire durante 10-15 minutos.
16. Añadir 50 µL de solución de rehidratación de ADN.
17. Añadir 1.5 µL de solución de RNAsa a la muestra de ADN purificada. Agitar la muestra durante 1 segundo. Centrifugar brevemente en microcentrífuga durante 5 minutos para recoger el líquido e incubar a 37°C durante 15 minutos.
18. Rehidratar el ADN incubando a 65°C durante 1 hora. Mezclar periódicamente la solución golpeando suavemente el tubo. Alternativamente rehidratar el ADN incubando la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4°C.
19. Almacenar el ADN a 2-8°C.

**Anexo 3:** *Identificación fenotípica mediante claves dicotómicas.*

Se hace uso del protocolo Jean Williams-Woodward de claves dicotómicas para la identificación de hongos simplificada.

- <https://athenaeum.libs.uga.edu/bitstream/handle/10724/35019/fungikey.pdf?sequence=1>