

**Caracterización del agente causal de la mancha aceitosa de gulupa (*Passiflora edulis*) y  
evaluación del efecto bactericida de productos químicos y desinfectantes *in vitro***

Estudiante:

Juanita Andrea Maldonado Rodriguez

Directora:

I.A., MSc, Ph.D Linda Jeimmy Rincón Rivera

Codirectora:

Microbióloga, MSc, Ph.D Adriana González Almario

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio ambiente ECAPMA

2024

### **Dedicatoria**

Este trabajo de tesis está dedicado a mis padres Miryam Rodriguez y Pedro Maldonado, junto a mi hermano Juan Camilo Maldonado quienes, fueron mi mayor motor en todo momento, con su motivación, amor, comprensión, tranquilidad y apoyo incondicional, han hecho posible forjar una mejor persona y profesional.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios y a la vida por permitirme vivir esta etapa de mi vida con mucho amor y pasión hacia lo que escogí como carrera profesional, la agronomía resulto ser una parte de mi alma que solo pude ver con ojos del corazón.

A la universidad Nacional abierta y a distancia que me permitió forjarme en su institución, a su vez también agradezco a la Universidad Nacional de Colombia por abrirme las puertas como una estudiante más que aprovecho al máximo todo su conocimiento, adquiriendo aprendizajes de gran valor que repercutirán en un futuro cercano.

Mi mayor gratitud, amor y agradecimiento a mis asesores de tesis: Linda Rincón y Adriana González, Directora y Co-Directora respectivamente, por llenarme de conocimiento en cada paso de la realización de este trabajo con paciencia, apoyo constante y colaboración ante cualquier necesidad de mi parte.

Agradezco al laboratorista Rubén Darío Cruz por su asistencia en todo momento, apoyándome en las actividades diarias que exige el laboratorio con paciencia y calidez, también al profesional Jesús León quien me brindó conocimientos y apoyo en los momentos indicados, además de todo el apoyo del profesor Alexander Galindo en campo.

A mis bellos padres que son lo más grande en mi vida junto a mi hermano que siempre han estado a mi lado con cariño en todo momento para cumplir cada meta y propósito ayudándome a sacar lo mejor de mi persona, motivándome a diario para ser una gran profesional en mi campo. A mis familiares y amigos que también fueron parte de este bello camino, siendo testigos de mi trabajo y crecimiento, que me aportaron con su apoyo y generándome tranquilidad para la conclusión de esta meta.

## Resumen

La producción de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) es limitada por enfermedades, siendo la mancha aceitosa una de las más importantes debido al daño que causa sobre el tejido vegetal y los frutos afectando su apariencia y calidad. En este estudio, se realizó la caracterización bioquímica, morfológica, patogénica y molecular de aislamientos bacterianos obtenidos a partir de hojas y frutos de gulupa con lesiones típicas de la mancha aceitosa, recolectados en el municipio de Venecia, Cundinamarca. Asimismo, se evaluó *in vitro* la sensibilidad de la bacteria fitopatógena a productos comerciales y alternativos a base de antibióticos, fosfitos, dióxido de cloro y sulfato de cobre, utilizados para el manejo de enfermedades bacterianas. De acuerdo con la caracterización bioquímica y morfológica de los 18 aislamientos obtenidos, cinco de ellos correspondieron al género *Xanthomonas* y molecularmente la amplificación con los marcadores 16S ARNr y los genes multilocus *fusA*, *gapA*, *gyrB* y *efp* confirmaron su identidad como *X. phaseoli* pv. *passiflorae*. En las pruebas de patogenicidad realizadas en plantas de gulupa de 4 meses, la bacteria reprodujo síntomas en hojas que correspondieron a manchas necróticas de color pardo y bordes con aspecto aceitoso y desprendimiento de éstas por el peciolo, corroborando que el aislamiento bacteriano era el agente causal de la mancha aceitosa. En las pruebas bajo condiciones *in vitro* los productos a base de antibióticos y sulfato de cobre a 0,7 g/L y 0,7 g/L respectivamente, presentaron un efecto biocida sobre la bacteria al detectar halos de inhibición de crecimiento alrededor del pozo donde se encontraba el compuesto. Por tanto, se confirma la presencia de la mancha aceitosa de la gulupa en frutos y hojas con síntomas de la enfermedad provenientes del municipio de Venecia-Cundinamarca, así como se sugiere de su agente causal *X. phaseoli* pv. *passiflorae*, una cepa sensible a los antibióticos y sulfato de cobre en condiciones *in vitro*.

**Palabras clave:** Gulupa; bacteriosis; Passifloraceae, *Xanthomonas phaseoli* pv. *passiflorae*, sulfato de cobre, antibióticos

### Abstract

Diseases limit the production of gulupa (*Passiflora edulis* Sims), the oil spot is the most important due to the damage on leaves and fruits, affecting their appearance and quality. The study involved the biochemical, morphological, pathogenic, and molecular characterization of bacterial isolates obtained from leaves and fruits of gulupa with typical oil stain lesions, collected in the municipality of Venecia, Cundinamarca. Similarly, *in vitro* experiments were performed to evaluate the sensitivity of phytopathogenic bacteria to commercial and alternative products based on antibiotics, phosphites, chlorine dioxide, and copper sulfate, used in the management of bacterial diseases. According to the biochemical and morphological characterization of the 18 isolates obtained, five of them corresponded to the genus *Xanthomonas* and the molecular amplification with the RNAr 16S markers and the multilocus genes *fusA*, *gapA*, *gyrB*, and *efp* confirmed the identity as *X. phaseoli* pv. *passiflorae*. In pathogenicity tests carried out on 4-month-old gulupa plants, the bacterium reproduced symptoms on leaves that corresponded to brown necrotic spots with oily edges, and leaf detachment from the petiole, confirming that the bacterial isolate was the causal agent of the oily spot. Under *in vitro* conditions, the antibiotic solution at 0.7 g/L and copper sulfate at 0.7 g/L showed a biocidal effect on the bacteria by detecting growth inhibition halos around the well where the compound was located. The presence of the oily spot in fruits and leaves from the municipality of Venecia-Cundinamarca is confirmed, It is suggested as well as its causal agent *X. phaseoli* pv. *passiflorae* a strain sensitive to antibiotics and copper sulfate under *in vitro* conditions.

**Keywords:** Gulupa; bacteriosis; Passifloraceae, *X. phaseoli* pv. *passiflorae*, copper sulphate, antibiotics

## Tabla de contenido

<b>Introducción .....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>20</b>
Objetivo General .....	20
Objetivos Específicos .....	20
<b>Marco Teórico .....</b>	<b>21</b>
Origen y Distribución .....	21
Importancia Económica.....	21
Taxonomía y Morfología .....	22
Requerimientos Edafoclimáticos.....	23
Principales Enfermedades para el Cultivo .....	24
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>26</b>
Reconocimiento de la Sintomatología en Campo y Toma de Muestras .....	26
Obtención de Aislamientos Bacterianos .....	26
Obtención y Conservación de Cultivos Puros.....	27
Caracterización Morfológica y Bioquímica de los Aislamientos Bacterianos.....	27
Pruebas de Patogenicidad.....	27
Caracterización Molecular de los Aislamientos Bacterianos .....	28
<i>Extracción de ADN</i> .....	28
<i>Amplificación de Región 16S ARNr por PCR</i> .....	29

<i>Amplificación de Marcadores Multilocus (MLSA)</i> .....	29
<i>Análisis de las Secuencias</i> .....	31
Evaluación de efecto biocida de antibióticos, fosfitos, sulfatos de cobre y desinfectantes bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	35
<b>Resultados y Discusión</b> .....	<b>38</b>
Reconocimiento de Síntomas de la Enfermedad.....	38
Caracterización Morfológica y Bioquímica de los Aislamientos Bacterianos.....	39
Pruebas de Patogenicidad.....	43
Pruebas Moleculares .....	47
Evaluación de Efecto Biocida de Solución a Base de Antibióticos, Fosfitos, Sulfatos de Cobre y Desinfectantes Bajo Condiciones <i>In Vitro</i> .....	58
Conclusiones .....	65
Perspectivas.....	66
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>67</b>
<b>Apéndice</b> .....	<b>79</b>

## Lista de Figuras

Figura 1 .....	37
<i>Modelo de distribución in vitro</i> .....	37
Figura 2 .....	38
<i>Lesiones observadas en campo de gulupa (Passiflora edulis Sims)</i> .....	38
Figura 3 .....	39
<i>Muestra foliar de gulupa recolectada en campo</i> .....	39
Figura 4 .....	40
<i>Tinción de Gram del aislamiento 16A</i> .....	40
Figura 5 .....	40
<i>Morfología de las colonias bacterianas del aislamiento 16A.</i> .....	40
Figura 6 .....	43
<i>Crecimiento característico del género Xanthomonas sp. obtenido en algunos medios de cultivo con los aislamientos bacterianos provenientes de hojas con síntomas de mancha aceitosa.</i> .....	43
Figura 7 .....	45
<i>Sintomatología observada en las pruebas de patogenicidad con el aislamiento 16A y 7B en hojas de gulupa (Passiflora edulis Sims).</i> .....	45
Figura 8 .....	48
<i>Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR del gen</i> .....	48
Figura 9 .....	49
<i>Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR obtenidos para el aislamiento 16A con los multilocus fusA, gyrB, gapA, efp</i> .....	49
Figura 10 .....	55

	10
<i>Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S ARNr</i> .....	55
Figura 11. ....	55
<i>Árbol filogenético con las secuencias de multilocus fusA</i> .....	55
Figura 12 .....	56
<i>Árbol filogenético con las secuencias de multilocus gapA</i> . ....	56
Figura 13 .....	56
<i>Árbol filogenético con las secuencias de multilocus gyrB</i> .....	56
Figura 14 .....	57
<i>Árbol filogenético con las secuencias de multilocus efp</i> .....	57
Figura 15 .....	57
<i>Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias nucleotídicas parciales concatenadas de los genes 16S, fusA, gapA, gyrB y efp</i> .....	57
Figura 16 .....	58
<i>Evaluación del efecto biocida de diferentes compuestos sobre el crecimiento de la cepa X. phaseoli pv. passiflorae 16A</i> .....	58
Figura 17 .....	61
<i>Halos de inhibición del crecimiento de la cepa X. phaseoli pv. passiflorae 16A</i> .....	61

## Lista de tablas

Tabla 1 .....	30
Secuencia de los primers utilizados para la amplificación por PCR de los marcadores moleculares 16s ARNr y los genes <i>fusA</i> , <i>gapA</i> , <i>gyrB</i> y <i>efp</i> .....	
	30
Tabla 2 .....	31
Información de las secuencias utilizadas de los genes <i>fusA</i> , <i>gapA</i> , <i>gyrB</i> y <i>efp</i> de las diferentes especies de <i>Xanthomonas</i> y la secuencia de la anotación del genoma de <i>X. campestris pv.</i> <i>passiflorae</i> , usadas para la construcción del árbol filogenético .....	
	31
Tabla 3 .....	42
Resultados de pruebas bioquímicas de los aislamientos obtenidos de hojas con síntomas de mancha aceitosa .....	
	42
Tabla 4 .....	51
Genes, accesiones del género <i>Xanthomonas</i> utilizados en el análisis de las secuencias y porcentaje de similitud.....	
	51

**Lista de Apéndices**

Apéndice A .....	79
Registro fotográfico del material vegetal muestreado y de los aislamientos bacterianos obtenidos .....	79

## Introducción

La gulupa (*Passiflora edulis* Sims), es catalogada como la fruta exótica de mayor importancia en Colombia, siendo la más exportada después del aguacate y el limón Tahití (Bernal, 2022). Este cultivo es altamente rentable, genera buena tasa de empleo y presenta una producción de 13,161 t y un rendimiento de 24,74 t/ha al año (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021). Entre los principales departamentos productores se encuentran Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Tolima (Agronet, 2021). Pachón et al. (2006) y Jiménez et al. (2012), afirman que en Colombia la producción de gulupa puede realizarse en distintos climas, desde 16 °C hasta 25 °C, pero generalmente, los mayores rendimientos se obtienen en temperaturas entre los 18 y 25 °C. No obstante, las enfermedades son la principal limitante para la producción de la gulupa, disminuyendo áreas de siembra a causa de diferentes patógenos, entre los que se encuentran virus como el virus del mosaico del pepino CMV, virus del mosaico de la soja SMV y el virus del mosaico transmitido por el pulgón del caupí CoABMV (Riascos et al., 2012), y hongos como *Fusarium oxysporum*, que genera la enfermedad conocida como secadera; en cuanto a las enfermedades que afectan al fruto, se reporta la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y la roña causada por *Cladosporium* sp. que causan pérdidas que pueden llegar al 30% de la producción exportable (Riascos, 2011).

Entre los patógenos que afectan las hojas, y que están asociados con el síntoma de mancha aceitosa se encuentran asociadas bacterias entre las que se destacan *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas* sp. (Benítez et al.,

2011). Diversos estudios reportan que las bacterias *X. axonopodis* y *X. campestris* no solamente afectan foliarmente a la gulupa, también pueden llegar a infectar el fruto, con la aparición de manchas de color castaño o transparente con margen de aspecto aceitoso en la corteza del mismo (Benítez et al., 2011; Villegas, et al., 2012; Guerrero, et al., 2010; Rodríguez, et al., 2022). Gran parte de las investigaciones acerca del patógeno causante de la macha aceitosa en gulupa, a través de pruebas de patogenicidad con *X. axonopodis* y *X. campestris*, han generado síntomas en hojas y frutos, aunque en lapsos de periodos de tiempo diferentes. Para el caso de pruebas de patogenicidad con *X. axonopodis* la necrosis y el halo aceitoso se presentaron en la primera y segunda semana pos- inoculación mientras que con *X. campestris* se presentaron síntomas hasta la tercera semana (Benítez, 2010).

Las bacterias del género *Xanthomonas* son Gram negativas y bioquímicamente se clasifican como aerobias estrictas de acuerdo con la prueba de Hugh and Leifson, almidón positivo, KOH 3% positivo, oxidasa negativa, fermentadoras negativas de azúcares en TSI, y morfológicamente la mayoría de las cepas son mucoides en YDC y producen pigmentación de color amarillo (Schaad, 2001).

La enfermedad de la mancha aceitosa generada por *X. axonopodis* afecta las hojas causando diversa sintomatología, Benítez y Hoyos (2009) describen manchas foliares amarillas en forma de "V", manchas punteadas y concéntricas, como también manchas necróticas con exudado aceitoso. En fruto, se presentan manchas aceitosas superficiales que al presentar ataques severos por la bacteria producen abundante exudado aceitoso, llevando a generar lesiones necróticas severas, marchitamiento de las plantas y el desprendimiento de las hojas por el peciolo (Benítez y Hoyos, 2009).

Se estima que las pérdidas en rendimiento por esta enfermedad, bajo condiciones favorables pueden llegar al 95% (Benítez et al., 2011; Mora et al., 2009). Por otro lado, síntomas similares a los descritos anteriormente se reportaron por primera vez por Pereira (1969) en Brasil y fueron relacionados con la especie *X. axonopodis*. Adicionalmente, Castillo y Granada (1995), reportaron a *X. axonopodis* como agente causal de los síntomas descritos con anterioridad en maracuyá, cultivada en Colombia.

En campo, las medidas de manejo de la mancha aceitosa se basan principalmente en la aplicación de ingredientes activos a base de compuestos cúpricos y antibióticos (Montoya et al., 2013; Farfán et al., 2014), trayendo como consecuencia la generación de cepas resistentes. Debido a lo anterior, en este trabajo se planteó como objetivos caracterizar biológica, morfológica, patogénica y molecularmente el agente causal de la mancha aceitosa en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) y evaluar el efecto biocida *in vitro* de compuestos a base de antibióticos, fosfitos, sulfatos de cobre y desinfectantes sobre el agente causal de la mancha aceitosa.

## Objetivos

### Objetivo General

Caracterizar del agente causal de la mancha aceitosa de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) y evaluar el efecto bactericida de productos químicos y desinfectantes *in vitro*

### Objetivos Específicos

Caracterizar los aislamientos bacterianos asociados a la sintomatología de la mancha aceitosa en un cultivo comercial de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en Venecia (Cundinamarca).

Evaluar el efecto biocida *in vitro* de moléculas alternativas y desinfectantes sobre el agente causal de la mancha aceitosa.

## **Marco Teórico**

### **Origen y Distribución**

La gulupa es un fruto de una pasiflorácea que proviene del sur de Brasil, Paraguay y del norte de Argentina y que se ha cultivado en África, Asia y Oceanía. En América, se ha diversificado ampliamente en la región andina, específicamente en las montañas de los andes tropicales de Colombia, en el cual crece por encima de los 1500 msnm (Ocampo y Wyckhuys, 2012), y que de acuerdo con registros botánicos existen más de 58 especies endémicas que en un principio fueron establecidas como plantas en huertos caseros (Uribe, 2017).

### **Importancia Económica**

El territorio europeo es el principal destino para su exportación, cuya cifra ha aumentado un 3,8% pasando de USD FOB 33,25 millones en 2019 a USD FOB 34,51 millones para el 2020 (Analdex, 2021). El principal destino de gulupa en Europa es Países Bajos con una participación del 81% del valor exportado, seguido por Bélgica y Reino Unido con 8,0% y 3,3% respectivamente. Sin embargo, también se ha registrado el crecimiento de otros mercados como Alemania, Grecia, Kuwait, Suiza y se empiezan a realizar ventas de este producto en países donde previamente no se habían realizado como Dinamarca, Ucrania y Polonia (Analdex, 2021). Por eso la importancia de fortalecer la producción de gulupa en el país ya que existen zonas productoras con gran potencial como lo son los departamentos de Antioquia, Tolima, Boyacá y Cundinamarca.

El cultivo de gulupa en el departamento de Cundinamarca alcanzó extensiones de 629 hectáreas en el año 2009, que produjeron 7728 toneladas, sin embargo, el área sembrada llegó a decrecer hasta las 122 ha y para el año 2016 se presentó una producción de 1547 ton debido en parte a las limitantes de producción que deben enfrentar los productores, entre las que se resalta

la presencia de plagas y enfermedades (Hernández et al., 2011). No obstante, debido al potencial de producción y exportación del fruto de la gulupa, este ha sido acogido por los productores del departamento de Cundinamarca hasta alcanzar en el año 2019 la siembra de 203 ha, con una producción de 2578 ton (Agronet, 2021). Esta tendencia al aumento del área y producción de este cultivo en ese departamento se ha atribuido a la aplicación de estrategias de manejo eficaces en el control de enfermedades la cual incluye la mancha aceitosa, que ha llegado a alcanzar niveles de incidencia de hasta el 95 % en el sur del Sumapaz (Cundinamarca) reduciendo su producción (Montoya et al., 2013).

### **Taxonomía y Morfología**

De acuerdo con el Instituto de Ciencias Naturales (*ICN*) de la Universidad Nacional de Colombia (2012), la gulupa se sitúa en el siguiente contexto taxonómico.

Grupo: Angiosperma

Clase: Dicotiledoneas

Subclase: Archiclamydae

Orden: *Violales*

Familia: *Passifloraceae*

Género: *Passiflora*

Especie: *edulis* Sims.

Morfológicamente según Pérez y Liscano (2012), la gulupa posee un tallo herbáceo estriado y leñoso, de color verde, las ramas con nudos y entre nudos originan una yema floral, dos estípulas lineares, una hoja y un zarcillo que permiten que la planta se adhiera correctamente a su soporte al ser trepador.

Las hojas son verdes, glabras, con nervaduras pronunciadas de tres lóbulos. Tiene un sistema radical completamente ramificado, sin raíz prominente de modo que es superficial (García, 2002).

La flor es solitaria y hermafrodita, vistosa con cinco pétalos, cinco sépalos expandidos, de color blanco y tonalidades verdes con márgenes blancos en el envés, existiendo tres tipos de flor de acuerdo con la posición de los estigmas. El fruto es una baya de forma ovoide, con una cáscara de consistencia dura, lisa y cerosa, que en estado inmaduro es de color verde y toma una coloración púrpura oscuro al madurar siendo delicada al tacto lo que la convierte en un problema a la hora de su recolección y almacenamiento; debido a que esta capa se daña con facilidad manchando el fruto, facilitando el ingreso de patógenos que afectan la calidad y disminuyendo la vida útil del fruto en poscosecha (Orjuela et al., 2011). Finalmente, sus semillas son de forma acorazonada de color negro y están cubiertas por mucílago de color amarillo (Ocampo y Wyckhuys, 2010, 2012; Pérez y Liscano, 2012).

### **Requerimientos Edafoclimáticos**

En Colombia, la gulupa se produce en diferentes climas, con temperaturas de 16 a 24 °C (Pachón et al., 2006), la mejor producción se da entre 18 y 25 °C teniendo precaución en las heladas. Los tipos de suelo más aptos para su desarrollo son francos (arenosos y arcillosos), con pH entre 6,5 y 7,5 (Jiménez et al., 2012). Para la formación óptima de hojas, flores y frutos la planta necesita de 10 a 11 horas de luz, teniendo una alta sensibilidad ante los cambios de radiación solar que afectan la productividad y que en días nublados se reduce el crecimiento, cantidad de botones florares y apertura floral (Fischer et al., 2009) ocasionando un retraso en la maduración del fruto.

## Principales Enfermedades para el Cultivo

Entre las enfermedades que pueden ser potencialmente limitantes en esta passiflora, los de mayor relevancia son secadera causado por *Fusarium oxysporum*, roña ocasionada por *Cladosporium* sp., antracnosis causada por *Colletotrichum* sp. y Virus como; el potyvirus del mosaico de la soja (SMV) y el tymovirus del mosaico amarillo de la maracuyá (PFYMV) (Ramírez et al., 2017; Cardona et al., 2022).

Secadera: esta enfermedad se puede presentar en cualquier estado de madurez del fruto adherido a la planta, presentando rugosidades. En hojas se observa un patrón de clorosis uniforme y marchitez hacia otras ramas, generando finalmente una marchitez generalizada y por consiguiente defoliación severa (Ortiz y Hoyos, 2012). Esta enfermedad es una gran limitante llegando a causar pérdidas de hasta 100% del cultivo de gulupa (Hoyos, 2010).

Roña: Se considera la enfermedad más importante del cultivo de la gulupa ya que puede afectar todos los órganos aéreos de la planta, especialmente en el fruto, siendo la más reportada por los productores como una de las más limitantes (Uribe, 2017). Los síntomas corresponden a lesiones iniciales de color parda como ampollas, originando lesiones tenuemente hundidas que evolucionan a chancros, aunque si no evoluciona se pueden observar manchas circulares levemente hundidas, de borde definido generando necrosis en el centro, mientras que en hoja las lesiones son manchas redondas húmedas de color parda (necrosis) junto a esporulación gris verdosa en el centro (Riascos et al., 2012).

Antracnosis: los síntomas pueden presentarse en todos los órganos aéreos, permaneciendo en estado de latencia, presentando síntomas en periodo de estrés hídrico o en condiciones climáticas favorables como una alta humedad/temperatura que favorecen el desarrollo de la enfermedad (Castillo, 2014). En los frutos los síntomas se caracterizan por la

presencia de hundimientos de forma circular con presencia de masas negras o anaranjadas en el centro. Estas lesiones pueden extenderse y generar una pudrición seca del fruto. En hojas se presentan manchas necróticas rodeadas por un halo verde oscuro, originando grandes lesiones lo cual hace que la hoja torne a un color amarillo, desprendiéndose de la planta (Uribe, 2017).

Mosaico de la soja (SMV): Es ocasionado por un potyvirus, su sintomatología se relaciona con mosaicos rugosos, tonalidad verde oscuro junto a la distorsión de las hojas (Cardona et al., 2022).

Mosaico amarillo de la maracuyá (PFYMV): ocasionado por un tymovirus el cual prevalece principalmente en hojas generando mosaico leve o moteado en las nervaduras y generando enación (Jaramillo et al., 2018, 2019).

Mancha Aceitosa *Xanthomonas*: La mancha aceitosa denominada como bacteriosis, es una enfermedad de alta incidencia en el cultivo de Gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) ocasionada por *X. axonopodis* (Ramírez et al., 2017), que bajo condiciones favorables como épocas de lluvias con temperatura de 20 °C y una humedad media de aproximadamente 70% causan un ambiente constante y húmedo, dando inicio al establecimiento y en consecuencia al desarrollo de la enfermedad que al avanzar su sintomatología se puede observar que en hojas, son manchas necróticas amarillentas con aspecto aceitoso y en el fruto se presentan manchas aceitosas de color pardo (Benítez et al., 2011). Estos síntomas afectan la comercialización al cambiar la apariencia del fruto, lo que incide en la economía de los departamentos productores como lo es Cundinamarca.

## **Materiales y Métodos**

### **Reconocimiento de la Sintomatología en Campo y Toma de Muestras**

Se realizaron visitas de campo a una finca productora de gulupa de la Provincia del Sumapaz, ubicada en el municipio de Venecia en la que se identificaron plantas con síntomas típicos de la mancha aceitosa, colectando 21 muestras de hojas y frutos para su debido procesamiento en laboratorio. El material se envolvió en servilletas, se empacó en bolsas de papel y fue llevado, manteniendo condiciones de refrigeración al laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Se realizó el registro fotográfico de las muestras tomadas para hacer la descripción de la sintomatología propia de la enfermedad (Apéndice A).

### **Obtención de Aislamientos Bacterianos**

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, para ello se tomaron cortes de tejido de 0,5 cm<sup>2</sup> (tejido sano y enfermo). Estos fueron desinfectados con una solución de etanol al 70 % durante 30 segundos, seguido de hipoclorito de sodio al 1 % por 1 minuto y tres lavados con agua destilada estéril, cada uno de un minuto (Ortiz et al., 2011). Luego, el tejido desinfectado se maceró con ayuda de un pistilo en tubos plásticos estériles de 2 ml y de la suspensión obtenida se realizó una siembra directa por agotamiento en cajas de Petri con medio de cultivo agar nutritivo (AN), las cuales se incubaron a 28 °C en completa oscuridad. Posteriormente, a 48 horas de incubación se seleccionaron aquellas colonias aisladas de color amarillo y apariencia mucoide de acuerdo con la morfología del género bacteriano asociado con esta sintomatología (Schaad, 2001; Benítez et al., 2011).

## **Obtención y Conservación de Cultivos Puros**

A partir de los cultivos bacterianos crecidos se seleccionó una única colonia que se sembró por agotamiento en medio agar nutritivo para la obtención de un cultivo puro. Para la conservación de los aislamientos se transfirió una colonia proveniente del cultivo puro en 5 ml de caldo nutritivo y se puso en agitación constante aproximadamente durante 16-18 horas a 170 rpm. Transcurrido ese tiempo, se tomó 700 µl del cultivo bacteriano y se mezcló con 300 µl de glicerol al 20% en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se conservó a -80 °C.

## **Caracterización Morfológica y Bioquímica de los Aislamientos Bacterianos**

Para la identificación de los aislamientos bacterianos se realizó revisión de los caracteres morfológicos microscópicos por tinción de Gram y la aplicación de pruebas bioquímicas generales, como reacción al KOH al 3%, prueba de oxidasa, Hugh and Leifson, TSI (*Triple sugar iron*), crecimiento mucoso con producción de pigmento amarillo en YDC (*Yeast extract-dextrose-CaCO3*) y YPGA (*Yeast extract-bacteriological peptone- glucosa- agar*) e hidrólisis de almidón (Schaad, 2001; Botero et al., 1998; Koblitz et al., 2023).

## **Pruebas de Patogenicidad**

Con el fin de corroborar la patogenicidad y generación de síntomas en las plantas hospedantes, se realizaron pruebas de patogenicidad con los aislamientos que presentaron las características bioquímicas del género *Xanthomonas*. Para ello, plantas de gulupa de 3 meses de edad fueron inoculadas con una suspensión bacteriana a una concentración de  $1 \times 10^8$  células.ml<sup>-1</sup> (D.O 600nm: 0.2) mediante infiltración (20 µl) en las hojas adyacentes a los puntos de crecimiento (Castañeda, 2005; Ruz et al., 2008). Las plantas se mantuvieron en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, sede Bogotá, entre 60% y 95% de humedad relativa y 20-25 °C durante 4 a 5 semanas.

Posteriormente, se realizó seguimiento a las plantas hasta el desarrollo de síntomas y finalmente a partir del tejido enfermo se realizó el aislamiento e identificación del agente bacteriano para su confirmación, siguiendo la metodología explicada previamente.

Para el diseño experimental en las pruebas de patogenicidad se utilizaron tres plantas de gulupa de tres meses de edad por aislamiento. De cada planta se eligieron dos hojas jóvenes y cada hoja fue inoculada por infiltración en 3 puntos por el envés. La unidad experimental fue la hoja inoculada con *Xanthomonas* a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>. Del mismo modo se realizó la inoculación del control negativo que correspondió a *Pantoea* sp. (aislamiento 7B) y como testigo absoluto se utilizó una sola planta con dos hojas infiltradas con agua destilada estéril.

### **Caracterización Molecular de los Aislamientos Bacterianos**

#### ***Extracción de ADN***

La extracción de ADN se realizó a los aislamientos 4A, 7B y 16A, los cuales presentaron la morfología del género bacteriano que previamente fue reportado como el causante de la sintomatología evaluada en gulupa. Para la extracción se utilizó el Kit de purificación de ADN genómico Wizard-Protocolo rápido FB022 para bacterias Gram negativas (Promega, 2019). Cada una de las bacterias fue inoculada en 3 ml de caldo nutritivo y puestas en agitación constante aproximadamente durante 16-18 horas a 170 rpm. Transcurrido este tiempo, se transfirió 1 ml de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf de 1.5 ml y a partir de este se comenzó la extracción siguiendo las indicaciones del kit. Posteriormente, se verificó la calidad del ADN por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

### ***Amplificación de Región 16S ARNr por PCR***

La amplificación de la región 16S ARNr (Hauben, 1997) se realizó a partir del ADN bacteriano usando los iniciadores U1QUGP-Fn6 (5'CCA GCA GCC GCG GTA ATA C 3') y U2QUGP-Rn1 (5' GGC TAC CTT GTT ACG ACT TC 3') descritos por Barghouthi (2011), en reacciones de 25 µl de volumen que contenían 1X de Buffer + 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,32 µM de cada Primer; 0,2 mM de dNTPs, 0,8 U de Taq y 1 µl de ADN bacteriano. Las condiciones de amplificación fueron 33 ciclos de 94 °C por 90 s; 50 °C por 35 s; 72 °C por 105 s y una extensión final de 72 °C por 3 min (Barghouthi, 2011).

### ***Amplificación de Marcadores Multilocus (MLSA)***

Los genes *fusA*, *gapA* y *gyrB* fueron amplificados a partir del ADN del aislamiento 16A (el cual reprodujo los síntomas característicos de la enfermedad mancha aceitosa en las pruebas de patogenicidad), usando los iniciadores descritos en la tabla 1. Las condiciones de PCR fueron: 94 °C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s; 58°C por 30 s, y 72°C por 30 s; y extensión final de 72°C por 7 min (Popović, et al., 2019). Para el caso del iniciador *efp* la amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones de PCR: 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min; 1,5 min por 62°C; 1,5 min por 72°C; y extensión final de 72°C por 10 min (Mhedbi et al., 2013). La mezcla de reacción para la amplificación de los genes *fusA*, *gapA* y *gyrB* fue la misma a la utilizada para el gen 16 ARNr. La concentración de los reactivos de la mezcla para la amplificación del gen *efp* fueron 1X de Buffer + 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µM de cada Primer; 0,2 mM de dNTPs, 0,4 U de Taq y 1 µl de ADN (Mhedbi et al., 2013).

**Tabla 1***Secuencia de primers utilizados*

Gen	Primer	Secuencia Primer 5' -3'	Referencia Bibliográfica
16 S	U1QUGP-Fn6	CCAGCAGCCGCGGTAATAC	Barghouthi (2011)
	U1QUGP-Rn1	GGCTACCTTGTTACGACTTC	
<i>fusA</i>	fusA_F	TCTGGCSCARGARGAYCC	Almeida, et al. (2010)
	fusA_R	GCCTCTTCGTARTGGTCRAA	
<i>gapA</i>	gapA_F	GGCAATCAAGGTTGGYATCAACG	Almeida, et al. (2010)
	gapA_R	ATCTCCAGGCACTTGTTSGARTAG	
<i>gyrB</i>	gyrB_F	AAGTTCGACGACAACAGCTACAA	Almeida, et al. (2010)
	gyrB_R	GAMAGCACYGCGATCATGCCTTC	
<i>Efp</i>	efp_F	TCATCACCGAGACCGAATA	Mhedbi, et al. (2013)
	efp_R	TCCTGGTTGACGAACAGC	

*Nota.* Amplificación por PCR de los marcadores moleculares 16s ARNr y los genes *fusA*, *gapA*, *gyrB* y *efp*. *Fuente.* Autoría Propia

### **Análisis de las Secuencias**

Los productos de PCR del marcador 16S ARNr y de los genes multilocus (MLSA) *fusA*, *gapA*, *gyrB* y *efp* del aislamiento 16A, fueron secuenciados por el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular (SSIGMOL) de la Universidad Nacional de Colombia. Posteriormente, las secuencias de cada gen fueron alineadas y editadas usando el programa BioEdit V7.2 con el cual se estableció una secuencia consenso la cual fue comparada con la base de datos del National Center Biological Information (NCBI, 2023), utilizando el algoritmo Blastn.

Con el fin de realizar la identificación y ubicar taxonómicamente el aislamiento bacteriano a nivel de género y especie, se realizó una relación filogenética comparando las secuencias de las regiones genómicas obtenidas (*16S*, *fusA*, *gapA*, *gyrB* y *efp*) mediante la herramienta Mega X (Tamura et al., 2007). Posteriormente, se generó un árbol filogenético mediante el método de Maximum Likelihood con un análisis de bootstrap de 1000 réplicas concatenando las secuencias obtenidas de cada uno de los genes y utilizando genomas completos o parciales (Tabla 2) de cepas de referencia del género *Xanthomonas* y como grupo externo se utilizaron las secuencias de los genes correspondientes de *Stenotrophomonas maltophilia*.

### **Tabla 2**

*Información de secuencias utilizadas de los genes fusA, gapA, gyrB y efp*

Genes multilocus (MLSA) y coting	Grupo de Xanthomonas a la que pertenece la	Códigos del grupo (MLSA)	Accesiones del GenBank

	especie según Constantin, et al. (2016).	(genomas completos o parciales) según Constantin, et al. (2016) y coting (Harrison et al., 2023).	
<i>Efp</i>	<i>X. citri</i> (Grupo I)	LMG 941      KX171409.1	
		LMG 867      FJ376341.1	
		LMG 9325      FJ376266.1 CP002914.1	
	<i>X. euvesicatoria</i> (Grupo II)		FJ376266.1
		LMG 27970	MH194888.1 CP017190.1 KJ491312.1
		LMG 7455	CP012063.1 CP012057.1
	<i>X. phaseoli</i> (PG III)		MK243563.1
		LMG 29033	MH194907.1 CP012063.1 CP012057.1

		LMG 9055	MH194903.1 FJ376350.1
	<i>X. axonopodis</i> (Grupo IV)	LMG 982	HQ590807.1 HQ590826.1 FJ376304.1
		LMG 859	CP030178.1 KY354123.1
	<i>X. citri</i> (Grupo I)	AW12879	CP003778.1 CP073209.1
		LMG 9322	CP030169.1 CP026334.1
<i>gapA</i>	<i>X. euvesicatoria</i> (Grupo II)	LMG 27970	KM492067.1
	<i>X. phaseoli</i> (PG III)	LMG 29033	CP014347.1 CP083575.1
		LMG 695	CP014347.1
	<i>X. axonopodis</i> (Grupo IV)	LMG 982	KM457662.1 MK838482.1 JX013579.1
		LMG 859	CP030166.1 KX679459.1
<i>fusA</i>	<i>X. citri</i> (Grupo I)	LMG 941	CP030178.1 CP073209.1

	<i>X. euvesicatoria</i>	LMG 497	CP072268.1
	(Grupo II)	LMG 9325	CP002914.1
	<i>X. phaseoli</i> (PG III)	LMG 29033	CP083575.1 CP012057.1
		LMG 695	CP014347.1
	<i>X. axonopodis</i> (Grupo IV)	LMG 982	OK044140.1 KM457984.1 JX013568.1
			CP030178.1
	<i>X. citri</i> (Grupo I)	LMG 859	JQ353949.1 CP030164.1 JQ323513.1
		AW12879	CP003778.1
		LMG 21894	EU015310.1
<i>gyrB</i>	<i>X. euvesicatoria</i> (Grupo II)	LMG 27970	EU015311.1 MH194938.1 EU015325.1 EU015326.1
			MK243598.1
	<i>X. phaseoli</i> (PG III)	LMG 29033	EU015331.1 CP012048.1
		LMG 695	MK243597.1 EU015332.1

			EU015344.1
	<i>X. axonopodis</i>	LMG 982	EU015316.1
	(Grupo IV)		EU015322.1
<hr/>			
	Proyecto		
	secuenciación:		
	Transferencia de		
Secuencia de la	patovares de		
anotación del genoma	<i>Xanthomonas</i>		
de <i>X. campestris</i> pv.	<i>campestris</i> a <i>X.</i>	NCPPB 2346	NZ_JAHTUK010000068.1
<i>passiflorae</i>	<i>euvesicatoria</i> , <i>X.</i>		
scf_7096_46.contig_1	<i>citri</i> y <i>X. phaseoli</i>		
	basados en la		
	secuencia del		
	genoma		

**Nota.** Secuencias utilizadas de los genes (*fusA*, *gapA*, *gyrB* y *efp*) de las diferentes especies de *Xanthomonas* y la secuencia de la anotación del genoma de *X. campestris* pv. *passiflorae*, usadas para la construcción del árbol filogenético. *Fuente.* Autoría Propia

### **Evaluación de efecto biocida de antibióticos, fosfitos, sulfatos de cobre y desinfectantes bajo condiciones *in vitro***

Bajo condiciones *in vitro* se evaluaron diferentes productos que son aplicados en campo para el control de la mancha aceitosa. Algunos de ellos tradicionales como solución de antibióticos, sulfato de cobre y otros alternativos como fosfitos y dióxido de cloro. El efecto biocida de estos compuestos se evaluó sobre el aislamiento 16A de proveniente de gulupa,

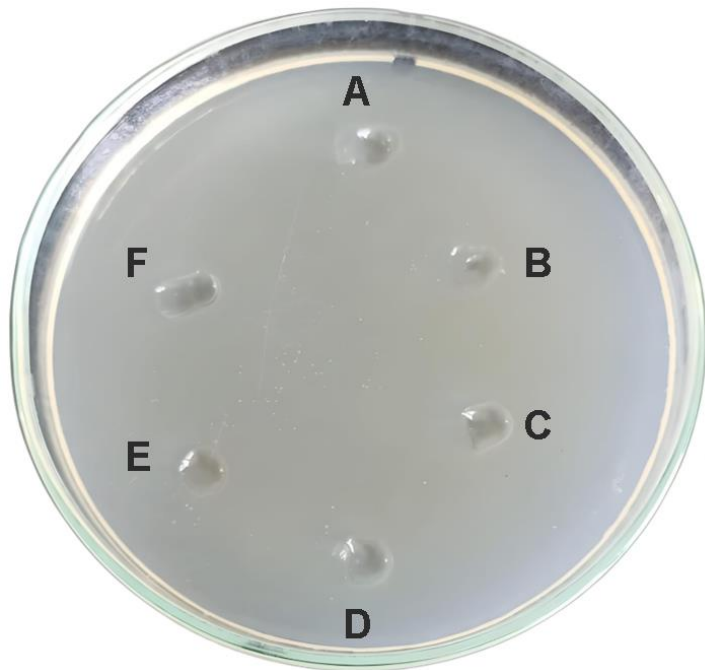
mediante la inhibición del crecimiento bacteriano. Para ello, cajas de Petri con medio agar nutritivo fueron inoculados vertiendo sobre éstas 10 ml de una suspensión bacteriana del aislamiento 16A de *Xanthomonas* a una concentración  $1 \times 10^8$  células.ml<sup>-1</sup> (D.O 600nm: 0.2) preparada en caldo nutritivo suplementado con agar bacteriológico al 1 %. La mezcla se dejó solidificar por 10 minutos aproximadamente sobre el agar. Posteriormente, se realizaron 6 pozos sobre el agar inoculado usando un sacabocados estéril de un diámetro de (6 mm), retirando parte del medio sin tocar el fondo (Figura 1). En cada uno de los pozos se depositaron alícuotas de 25 µl de cada uno de los compuestos, siendo éstos la solución de antibióticos, fosfitos, dióxido de cloro y sulfato de cobre a concentraciones de 0,7 g/L, 8 cc/l, 2 cc/l y 0,4 g/L respectivamente, dosis comerciales utilizadas en campo. El experimento se realizó por triplicado.

Posteriormente, las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 24 horas y la lectura de viabilidad de la bacteria frente a cada compuesto se realizó mediante la medición del diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de cada pozo (Florez et al., 2014).

Para el diseño experimental *in vitro* se utilizó un diseño completamente al azar con 3 repeticiones, de los cuales se realizó una distribución al azar de los tratamientos sulfato de cobre, fosfitos, solución de antibióticos (Sulfato de gentamicina + Clorhidrato de oxitetraciclina) y dióxido de cloro, con un control positivo (Streptomycin) y uno negativo (Agua destilada estéril) (Figura 1).

**Figura 1**

*Modelo de distribución in vitro del efecto biocida sobre el aislamiento 16A de Xanthomonas.*



*Nota.* A) Estreptomicina, B) sulfato de cobre, C) fosfitos, D) agua destilada estéril, E) solución de antibióticos, F) dióxido de cloro. *Fuente.* Autoría Propia

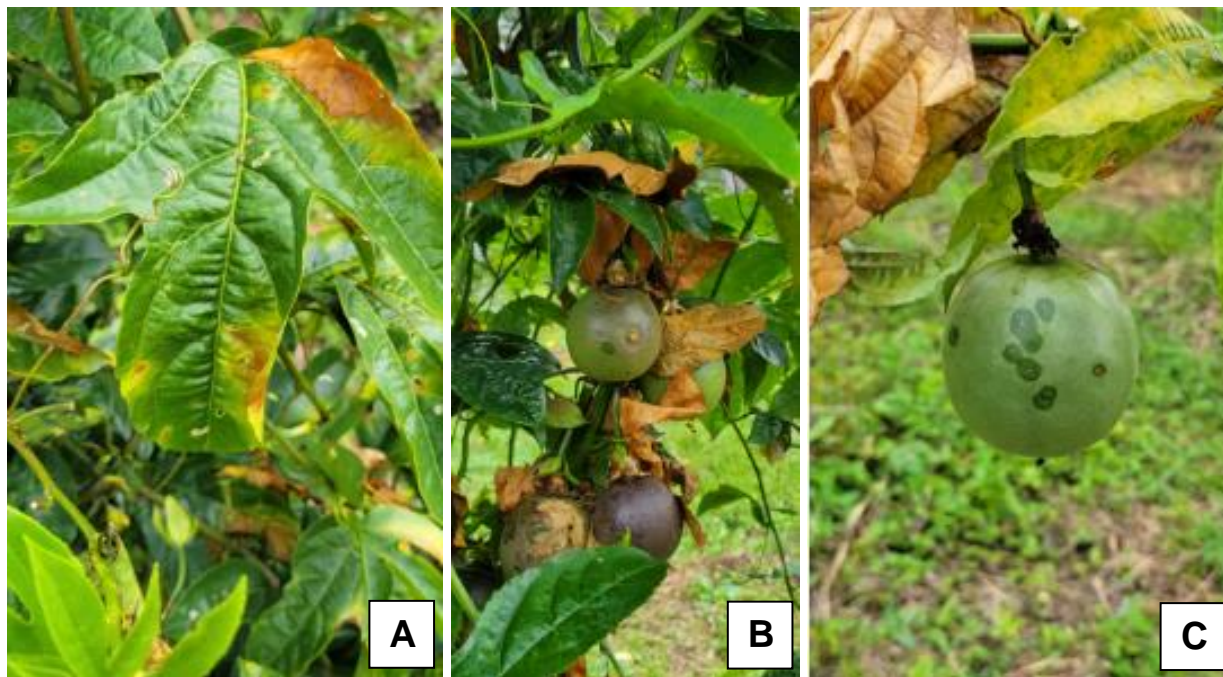
## Resultados y Discusión

### Reconocimiento de Síntomas de la Enfermedad

La sintomatología observada en campo correspondió foliarmente a manchas necróticas con aspecto aceitoso rodeadas de un halo clorótico. A medida que progresaba la enfermedad las lesiones necróticas y la clorosis se expandieron causando necrosis del tejido, conocida como tizón. Así mismo, se evidenció la presencia de nervaduras cloróticas en las hojas. En fruto se presentaron manchas de aspecto húmedo con centro necrótico (Figura 2), lo que concuerda con la sintomatología descrita por Benítez et al. (2011).

### Figura 2

*Lesiones observadas en campo de gulupa (Passiflora edulis Sims) características de la mancha aceitosa*



*Nota.* A) Manchas necróticas de color pardo, aspecto grasoso, rodeadas de un halo clorótico, que comienzan en los bordes de las hojas y que al coalescer generan un tizón. B) Planta de gulupa con hojas necróticas que representa un avance de la enfermedad, junto con frutos con manchas

de aspecto aceitoso. C) Fruto de gulupa con varias manchas de color verde oscuro y con aspecto aceitoso uniéndose unas a otras. *Fuente. Autoría Propia*

Para el muestreo se tomaron hojas con síntomas asociados a bacteriosis que consistieron en manchas necróticas de color pardo, apariencia aceitosa, clorosis en el borde de la lesión, presentando la sintomatología desde los bordes de la hoja (Figura 3).

### **Figura 3**

*Muestra foliar de gulupa recolectada en campo*



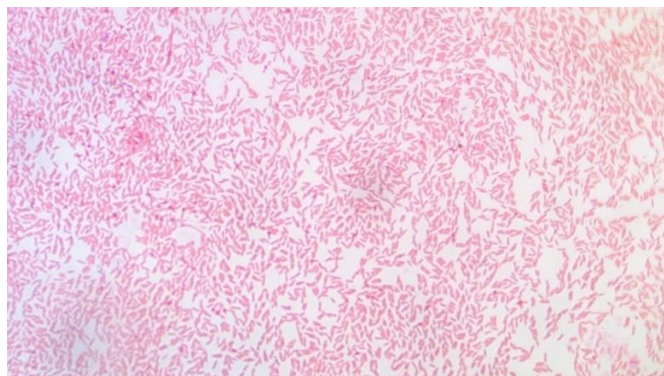
*Nota. Síntomas de bacteriosis fuente del aislamiento 16A de Xanthomonas. Fuente. Autoría Propia*

### **Caracterización Morfológica y Bioquímica de los Aislamientos Bacterianos**

A partir de las muestras foliares tomadas en campo con la sintomatología de mancha aceitosa se obtuvieron 18 aislamientos bacterianos (Apéndice A). Microscópicamente, todos correspondieron a bacilos Gram negativos (Figura 4). Morfológicamente las colonias presentaron un color amarillo en YDC y así mismo en medio YPGA y AN (Figura 5), con mayor pigmentación y mucosidad en medio YPGA. La forma de las colonias fue circular, con borde liso y superficie convexa. Sin embargo, la diferencia entre estas fue la consistencia la cual fue mucoide para las cepas 01, 02, 03, 05 y 16A.

**Figura 4**

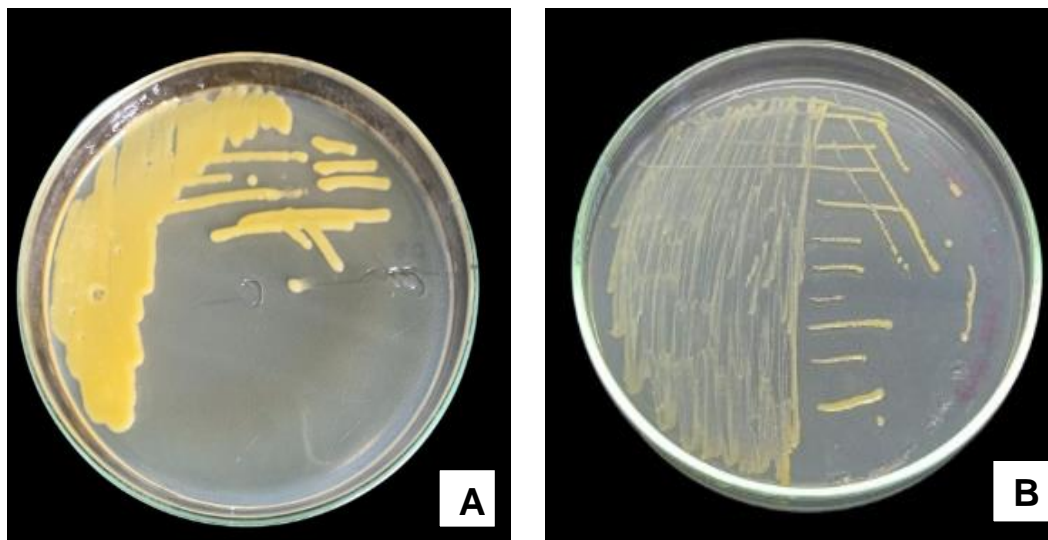
*Tinción de Gram del aislamiento 16A*



*Nota.* Bacilos cortos Gram negativos. 100x. *Fuente.* Autoría Propia

**Figura 5**

*Morfología de las colonias bacterianas del aislamiento 16A.*



*Nota.* A) medio YPGA (extracto de levadura, peptona bacteriológica, glucosa y agar). B) Agar Nutritivo. 48 horas de incubación a 28 °C. *Fuente.* Autoría Propia

Para el perfil bioquímico, se realizaron pruebas bioquímicas generales como, KOH 3%, oxidasa, Hugh and Leifson, TSI, YDC y almidón (Figura 6). De acuerdo con los resultados obtenidos todos los aislamientos fueron bacilos cortos gram negativos, oxidasa negativa y

presentaron una tonalidad amarilla de sus colonias en los medios de cultivo AN y YDC. Sin embargo, presentaron diferencias en las pruebas de TSI, Hugh-Leifson, TSI e hidrólisis de almidón, lo que permitió clasificarlos en dos grupos. Presentando dos perfiles, aquellos que presentaron un perfil de bacterias entéricas, anaerobia facultativa e hidrólisis de almidón negativa, perfil que corresponde con el género *Pantoea* y otro que correspondió a bacterias aerobia estricta, no fermentadoras de azúcares y que, si hidrolizaban el almidón, perfil que corresponde con el género *Xanthomonas* (Tabla 3 y Figura 6).

Los aislamientos 01, 02, 03, 05 y 16A obtenidos de hojas de gulupa con síntomas de mancha aceitosa presentaron el perfil morfológico y bioquímico característico de *Xanthomonas* sp., mientras que los aislamientos 04A, 06, 07B, 08, 09, 10, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 21 correspondieron al género *Pantoea* spp. (Tabla 3) de acuerdo con el perfil bioquímico establecido por Schaad (2001).

**Tabla 3***Resultados de pruebas bioquímicas*

Aislamiento	Producción de pigmentos amarillos YDC	KOH 3%	Hidrólisis de almidón	Oxidasa	Hugh and Leifson anaerobia facultativa (O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup> )  aerobia estricta (O <sup>+</sup> /F <sup>-</sup> )	Fermentación de glucosa y lactosa (TSI)	YPGA (Pigmentos amarillos y mucoides)
01	+	+	+	-	O <sup>+</sup> /F <sup>-</sup>	-	+
02	+	+	+	-	O <sup>+</sup> /F <sup>-</sup>	-	+
03	+	+	+	-	O <sup>+</sup> /F <sup>-</sup>	-	+
04A	+	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
05	+	+	+	-	O <sup>+</sup> /F <sup>-</sup>	-	+
06	-	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
07B	+	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
08	-	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
09	-	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
10	-	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
13	+	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
14	+	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
15	+	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-

16A	+	+	+	-	O <sup>+</sup> /F <sup>-</sup>	-	+
17	+	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
19	-	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
20	-	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-
21	-	+	-	-	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	+	-

*Nota.* Resultados pruebas bioquímicas de los aislamientos obtenidos de hojas con síntomas de mancha aceitosa. *Fuente.* Autoría Propia

### Figura 6

*Crecimiento característico del género Xanthomonas sp. obtenido en algunos medios de cultivo con los aislamientos bacterianos provenientes de hojas con síntomas de mancha aceitosa.*



*Nota.* A) crecimiento bacteriano con pigmentación amarilla en medio YDC, B) Crecimiento mucoides y con pigmento amarillo en medio YPGA, C) Formación de halo alrededor del crecimiento bacteriano por hidrólisis del almidón. *Fuente.* Autoría Propia

### Pruebas de Patogenicidad

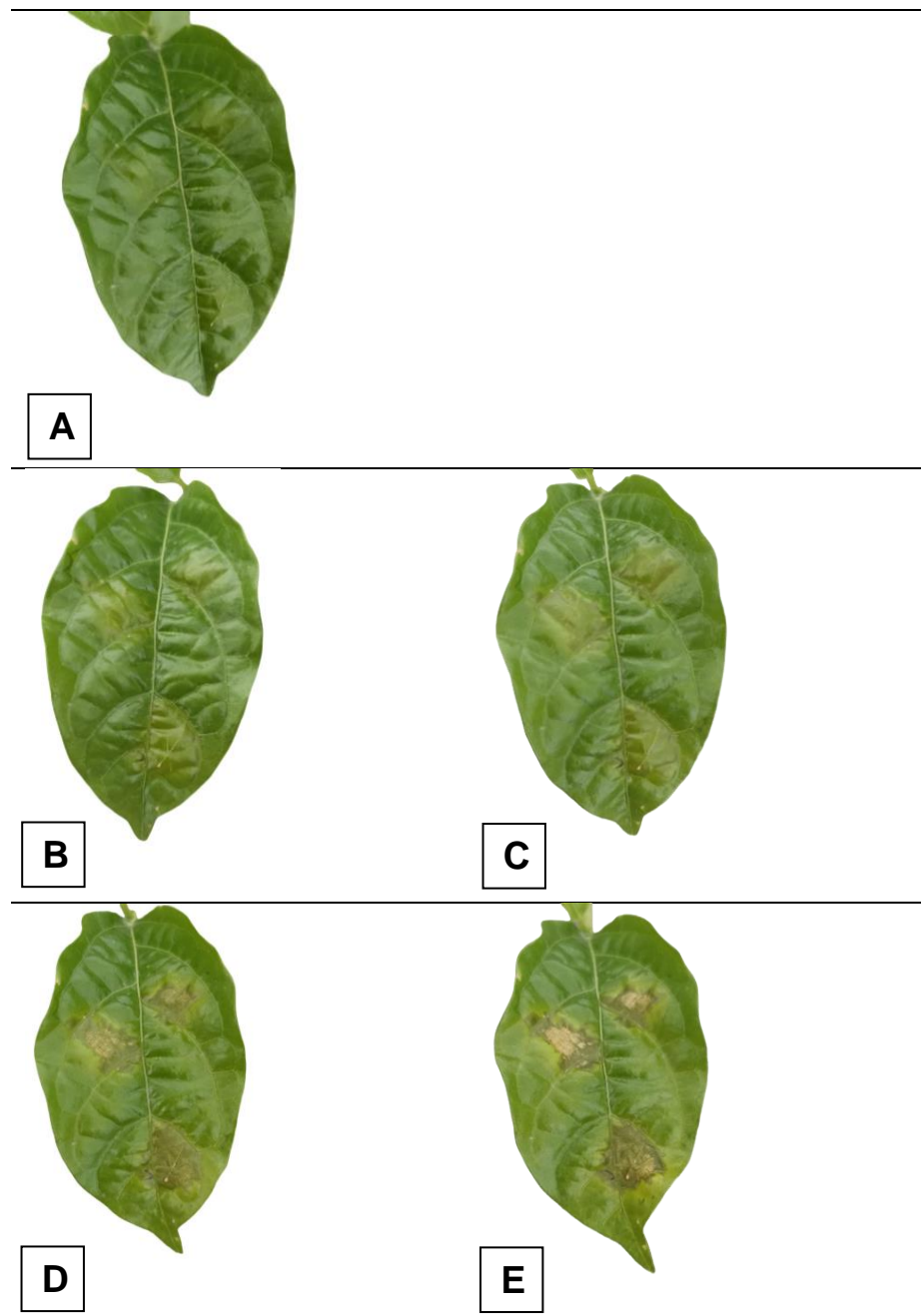
Los ensayos se realizaron bajo invernadero, en plantas de gulupa de tres meses de edad mantenidas bajo condiciones ambientales promedio de humedad relativa entre 60-95% y temperatura 20-25 °C.

Al realizar la inoculación con el aislamiento 16A, se reprodujeron los mismos síntomas que presentaron las hojas de las plantas en campo, como manchas necróticas de color pardo, aspecto grasoso, rodeadas de un halo clorótico, que al coalescer generaban un tizón. Los síntomas fueron visibles luego de 2 días de inoculación en las hojas más jóvenes (Figura 7, A) y en las más adultas luego de 3 días. Posteriormente se presentó clorosis en los puntos de inoculación (Figura 7. B y C) tornándose aceitosos (Figura 7. D) y necróticos (Figura 7. E, F, G). A partir del día 14 posterior a la inoculación (Figura 7. G) el progreso de los síntomas se detectó en todas las hojas de la planta de manera uniforme. Por otro lado, el aislamiento 7B no reprodujo síntomas, únicamente se perciben lesiones mecánicas que se generaron al momento de realizar la infiltración, por lo cual resultó no ser patogénico (Figura 7, J y K).

El avance de la enfermedad asociado con el progreso de los síntomas coincidió con lo reportado por Benítez et al., 2011, presentándose a partir del día 2 posterior a la inoculación e inicio de la clorosis desde el día 4, lo que corresponde al estado 1 y estado 2 de acuerdo con la escala sugerida por Benítez et al. (2011). La sintomatología típica de la enfermedad como manchas necróticas con aspecto aceitoso (estado 3 - estado 4, correspondientes a la escala mencionada) se observaron desde el día 8 y para los de hojas maduras hasta el día 10 post-inoculación (Figura 7). Además, se observó el desprendimiento de hojas por el peciolo desde el día 16.

**Figura 7**

*Sintomatología observada en las pruebas de patogenicidad con el aislamiento 16A y 7B en hojas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims).*





**F**



**G**



**H**



**I**



**J**



**K**



*Nota.* Aparición de manchas necróticas de color pardo claro, de aspecto aceitoso para el día D) 8, E) 10, F) 12, y G) 14 posterior a la inoculación. Hojas infiltradas con el aislamiento 7B que no desarrollaron síntomas al día J) 1 y k) 15. La concentración de la suspensión bacteriana inoculada fue  $1 \times 10^8$  UFC/ml (D.O  $600_{nm}=0,2.$ ) para los aislamientos 16A y 7B. Tratamiento (control): infiltración con agua destilada estéril, demostrando ausencia de síntomas al día H) 1 y I) 15, posterior a la inoculación. *Fuente.* Autoría Propia

Estos resultados permitieron clasificar al aislamiento 16A como patogénico ya que reprodujo los síntomas característicos de la enfermedad mancha aceitosa producida por *Xanthomonas* en las plantas inoculadas.

Se observó en los síntomas evaluados con la escala diseñada por Benítez et al. (2011) la presencia de clorosis y manchas necróticas de color pardo, con bordes de aspecto aceitoso que llevaban al desprendimiento de la hoja por el peciolo a medida que aumentaba la severidad de la enfermedad. Esto corrobora la correcta selección de los aislamientos, el método de inoculación y evaluación de los síntomas al lograr reproducir la enfermedad. Aspectos que coinciden con los resultados reportados por otros autores como Uribe (2017).

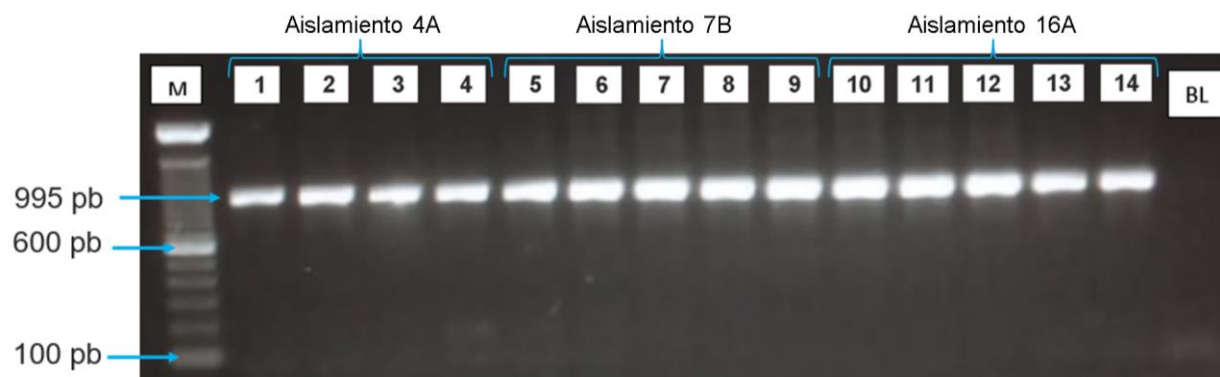
### **Pruebas Moleculares**

Se realizó la extracción de ADN total de tres aislamientos (4A, 7B y 16A) obtenidos de hojas de gulupa. Se seleccionaron aislamientos que cumplieran con el perfil morfológico, bioquímico y patogénico del agente causal de la mancha aceitosa y también otros que no fueron patogénicos y que presentaron el perfil de bacteria entérica. Se realizó la confirmación molecular de éstos mediante la amplificación por PCR del gen 16S ARNr, el cual generó un producto de aproximadamente 995 pares de bases (pb) (Figura 8). El análisis de las secuencias obtenidas permitió establecer que el aislamiento 16A presentó una identidad que corresponde con un

88.79% con secuencias reportadas para el género *Xanthomonas*. Las secuencias de los aislamientos 4A y 7B presentaron identidad con el género *Pantoea* con un 95% y 90% respectivamente, según la base de datos disponible en el Genbank usando el algoritmo Blastn.

### Figura 8

*Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR del gen 16S*

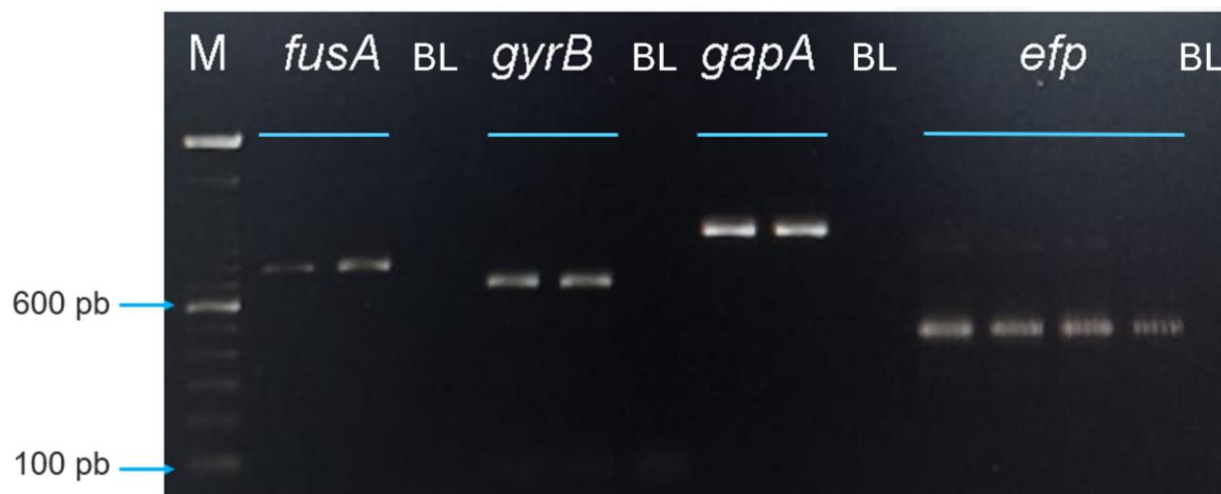


*Nota.* Amplificación del gen 16S ARNr (995 pb), de los aislamientos bacterianos obtenidos de hojas de gulupa (*Passiflora edulis* S.) con la sintomatología de mancha aceitosa. M, Marcador de peso molecular de 100 pb; carriles 1 al 14 producto de PCR de 995 pb obtenido de los aislamientos bacterianos (4A, 7B, 16A); BL, Blanco de reacción. *Fuente.* Autoría Propia

Para la confirmación molecular de la especie de *Xanthomonas* que correspondía al aislamiento 16A se trabajó con cuatro marcadores multilocus, de los cuales se obtuvieron los siguientes productos de amplificación: *fusA* (800 pb), *gapA* (900 pb), *gryB* (600 pb) y *efp* (445 pb) (Figura 9).

### Figura 9

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR obtenidos para el aislamiento 16A con los multilocus *fusA*, *gyrB*, *gapA*, *efp*



*Nota.* Productos de amplificación. M, Marcador de peso molecular de 100 pb; BL, Blanco de reacción. *Fuente.* Autoría Propia

De acuerdo con nuestros resultados, los productos de PCR obtenidos para el caso de *fusA*, *gapA* y *gyrB*, fueron de un tamaño diferente a los reportados por Almeida et al. (2010), (Tabla 4). No obstante, se hizo una comparación de las secuencias obtenidas de cada uno de los productos amplificados y se confirmó su correspondencia con el gen de interés.

Para el análisis filogenético se seleccionaron las secuencias obtenidas de cada uno de los genes amplificados del aislamiento 16A, los cuales fueron comparados de manera individual con las secuencias de cepas de referencia del género *Xanthomonas* reportadas por Constantin et al. (2016) (tabla 4) y (Figura 10, Figura 11, Figura 12, Figura 13, Figura 14) y de manera concatenada (Figura 15) con las secuencias reportadas por Constantin et al. (2016) y además con la secuencia originada de la anotación del genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

(NCPBB 2346), sinónimo de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, que de acuerdo con Harrison et al. (2023), hoy corresponde a *X. phaseoli* pv. *passiflorae*.

En estudios previos (Pereira 1969; Gonçalves y Rosato 2000; Benítez 2011) reportaron que las cepas de *Xanthomonas* aisladas de pasifloras pertenecían a las especies *X. axonopodis* o *X. campestris*. Posteriormente, resultados filogenéticos desarrollados con las secuencias de los genomas de cepas de referencia del género *Xanthomonas*, evidenció que los aislamientos provenientes de pasifloras pertenecen al patovar *passiflorae* dentro de la especie *X. phaseoli* (Harrison et al., 2023). Este autor a través de la comparación de genomas encontró que el patovar *passiflorae* presentaba una identidad promedio nucleotídica (ANI) del 93,42% con *X. axonopodis* y un 98,16% con *X. phaseoli*, siendo mayor con esta última especie. De acuerdo con estos resultados y el análisis filogenético realizado en este trabajo, se sugiere que el aislamiento 16A corresponde a la bacteria *X. phaseoli* pv. *passiflorae*.

**Tabla 4***Genes y accesiones del género Xanthomonas*

Genes multilocus (MLSA) y coting	Longitud de secuencia esperado (pb)	Longitud de secuencia obtenido (pb)	Grupos de <i>Xanthomonas</i> según Constantin, et al. (2016)	Accesiones de referencia (Constantin, et al., 2016) y coting (Harrison et al., 2023).		
				de referencia	Accesiones GenBank	Porcentaje similitud
<i>Efp</i>	445	445	<i>X. citri</i> (Grupo I)	LMG 941	KX171409.1	98.73%
				LMG 867	FJ376341.1	98.73%
			<i>X. euvesicatoria</i> (Grupo II)	LMG 9325	FJ376266.1 CP002914.1	98.42%
				LMG 27970	FJ376266.1 MH194888.1 CP017190.1 KJ491312.1	98.42%
				LMG 7455	CP012063.1 CP012057.1	99.37%
			<i>X. phaseoli</i> (PG III)	LMG 29033	MK243563.1 MH194907.1 CP012063.1	99.37%

					CP012057.1	
				LMG 9055	MH194903.1 FJ376350.1	99.37%
			<i>X. axonopodis</i> (Grupo IV)	LMG 982	HQ590807.1 HQ590826.1 FJ376304.1	99.06%
				LMG 859	CP030178.1 KY354123.1	83.05%
			<i>X. citri</i> (Grupo I)	AW12879	CP003778.1 CP073209.1	83.05%
				LMG 9322	CP030169.1 CP026334.1	83.05%
<i>gapA</i>	444	900	<i>X. euvesicatoria</i> (Grupo II)	LMG 27970	KM492067.1	82.20%
			<i>X. phaseoli</i> (PG III)	LMG 29033	CP014347.1 CP083575.1	83.47%
				LMG 695	CP014347.1	83.47%
			<i>X. axonopodis</i> (Grupo IV)	LMG 982	KM457662.1 MK838482.1 JX013579.1	79.04%
<i>fusA</i>	591	800	<i>X. citri</i> (Grupo I)	LMG 859	CP030166.1 KX679459.1 CP030178.1	93.33%

			LMG 941	CP073209.1	93.58%	
			<i>X. euvesicatoria</i>	LMG 497	CP072268.1	95.31%
			(Grupo II)	LMG 9325	CP002914.1	95.31%
			<i>X. phaseoli</i>		CP083575.1	
			(PG III)	LMG 29033	CP012057.1	95.06%
				LMG 695	CP014347.1	95.06%
			<i>X. axonopodis</i>		OK044140.1	
			(Grupo IV)	LMG 982	KM457984.1	95.31%
					JX013568.1	
					CP030178.1	
			<i>X. citri</i>	LMG 859	JQ353949.1	83.72%
			(Grupo I)		CP030164.1	
					JQ323513.1	
				AW12879	CP003778.1	83.72%
				LMG 21894	EU015310.1	84.25%
<i>gyrB</i>	411	600	<i>X. euvesicatoria</i>		EU015311.1	
			(Grupo II)	LMG 27970	MH194938.1	84.25%
					EU015325.1	
					EU015326.1	
			<i>X. phaseoli</i>		MK243598.1	
			(PG III)	LMG 29033	EU015331.1	84.78%
					CP012048.1	

	LMG 695	MK243597.1	84,78%
		EU015332.1	
		EU015344.1	
<i>X. axonopodis</i> (Grupo IV)	LMG 982	EU015316.1	84.96%
		EU015322.1	

---

Secuencia

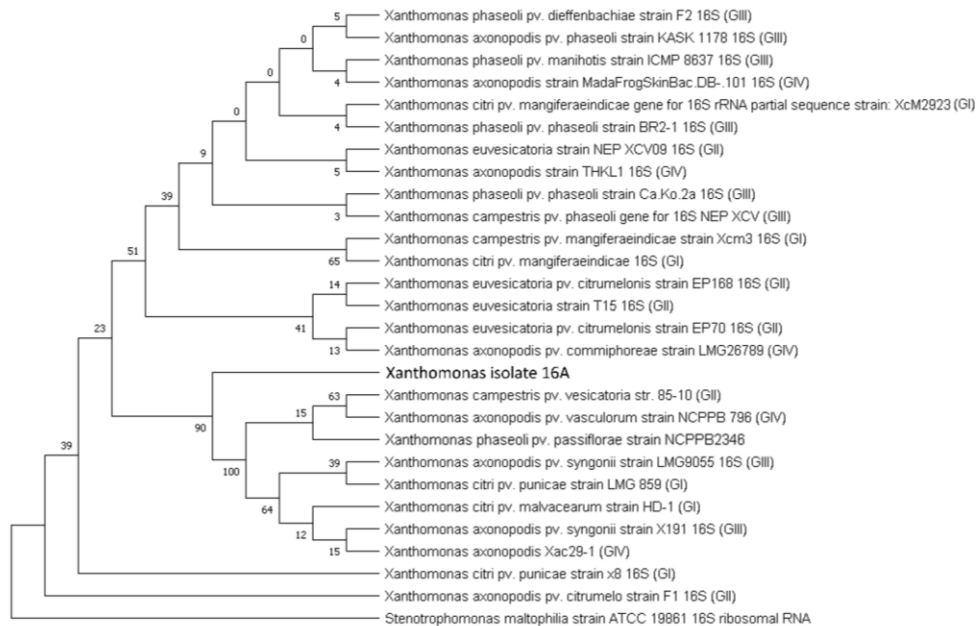
de la	Proyecto		
anotación	secuenciación:		
del	Transferencia de		
genoma	patovares de		
de <i>X.</i>	<i>Xanthomonas</i>	NZ_JAHTU	
<i>campestris</i> 8000 pb	<i>campestris</i> a <i>X.</i>	NCPPB 2346	K010000068. 99.26%
<i>s</i> pv.	<i>euvesicatoria</i> , <i>X.</i>	1	
<i>passiflora</i>	<i>citri</i> y <i>X.</i>		
<i>e</i>	<i>phaseoli</i> basados		
scf_7096	en la secuencia		
_46.conti	del genoma		
g_1			

---

*Nota.* Información utilizada del género *Xanthomonas* en el análisis de las secuencias y porcentaje de similitud. *Fuente.* Autoría Propia

**Figura 10**

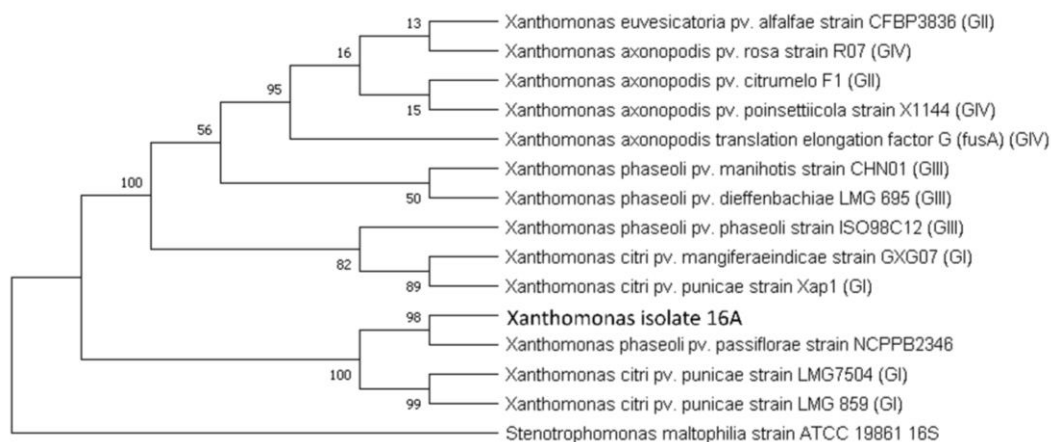
*Árbol filogenético con las secuencias del gen 16S ARNr*



*Nota.* MEGA X. Maximum Likelihood. Bootstrap: 1000 réplicas. Output: *Stenotrophomonas maltophilia*. *Fuente.* Autoría Propia

**Figura 11.**

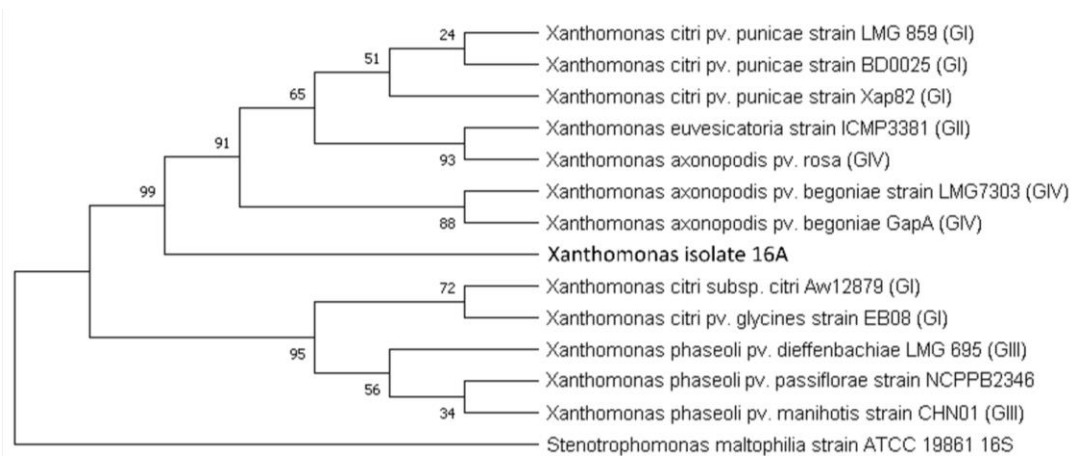
*Árbol filogenético con las secuencias de multilocus fusA.*



*Nota.* MEGA X. Maximum Likelihood. Bootstrap: 1000 réplicas. Output: *Stenotrophomonas maltophilia*. *Fuente.* Autoría Propia

**Figura 12**

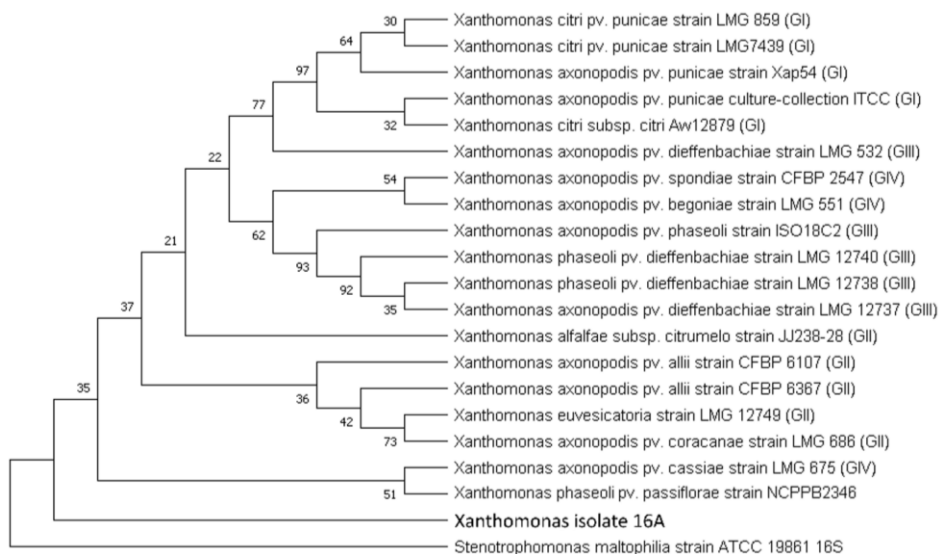
Árbol filogenético con las secuencias de multilocus *gapA*.



*Nota.* MEGA X. Maximum Likelihood. Bootstrap: 1000 réplicas. Output: *Stenotrophomonas maltophilia*. *Fuente.* Autoría Propia

**Figura 13**

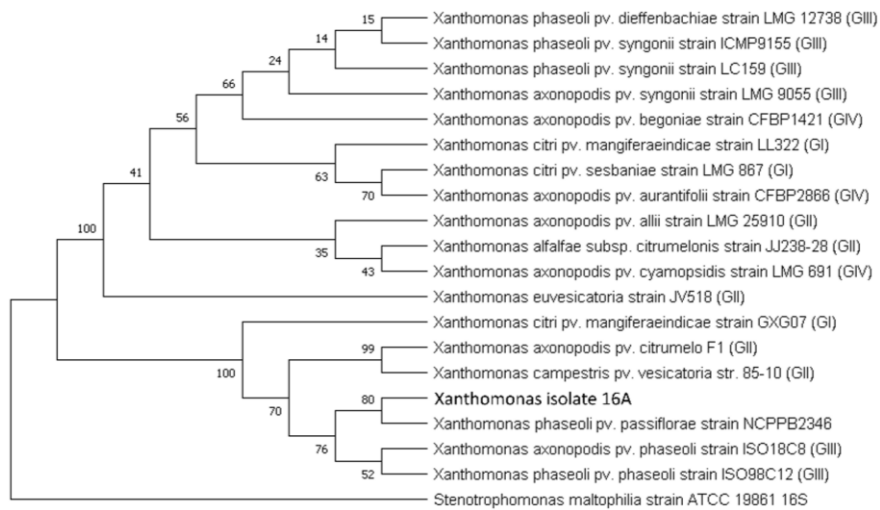
Árbol filogenético con las secuencias de multilocus *gyrB*



*Nota.* MEGA X. Maximum Likelihood. Bootstrap: 1000 réplicas. Output: *Stenotrophomonas maltophilia*. *Fuente.* Autoría Propia

Figura 14

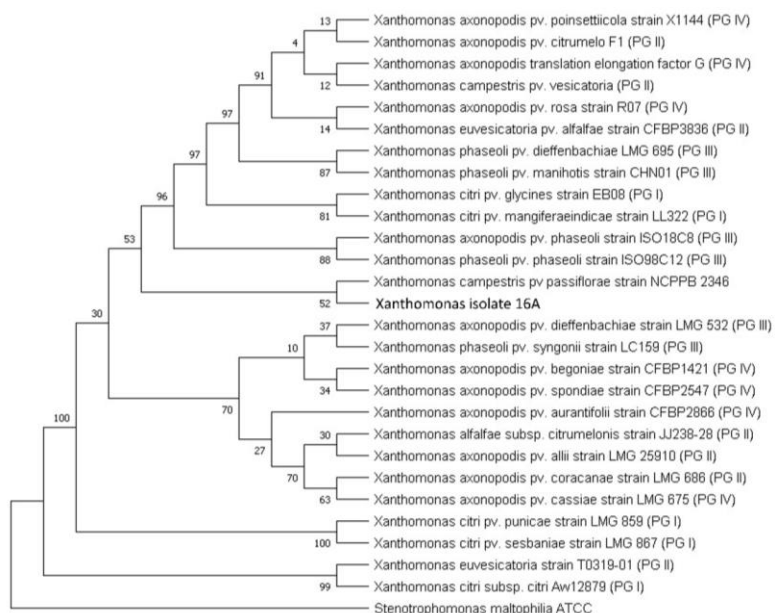
Árbol filogenético con las secuencias de multilocus *efp*.



Nota. MEGA X. Maximum Likelihood. Bootstrap: 1000 réplicas. Output: *Stenotrophomonas maltophilia*. Fuente. Autoría Propia

Figura 15

Árbol filogenético obtenido del análisis de las secuencias nucleotídicas parciales concatenadas de los genes *16S*, *fusA*, *gapA*, *gyrB* y *efp*



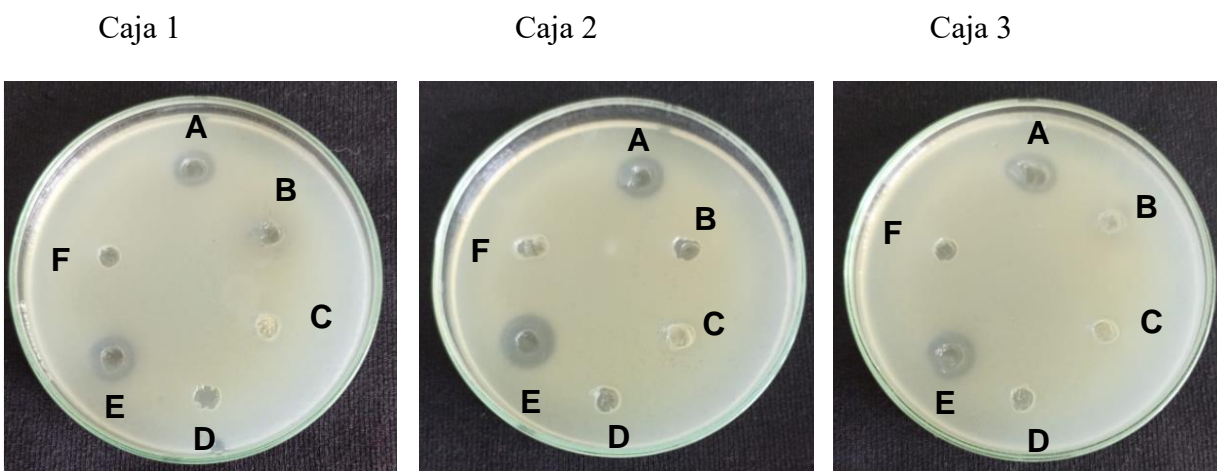
*Nota.* Secuencias analizadas con las de cepas de referencia del género *Xanthomonas* reportadas por Constantin et al. (2016) y con la secuencia originada de la anotación del genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (NCPBP 2346). MEGA X. Maximum Likelihood. Bootstrap: 1000 réplicas. *Fuente.* Autoría Propia.

### **Evaluación de Efecto Biocida de Solución a Base de Antibióticos, Fosfitos, Sulfatos de Cobre y Desinfectantes Bajo Condiciones *In Vitro***

Bajo condiciones *in vitro* se evaluaron los productos a base de antibióticos, fosfitos, sulfatos de cobre y desinfectantes. Para ello se utilizó el reactivo estreptomycin control positivo (Figura 16, A) y agua destilada estéril como control negativo (Figura 16, D), obteniendo un total de seis productos a evaluar por caja, uno en cada pozo. Luego de 24 horas de incubación, el tratamiento sulfato de cobre y la solución a base de los antibióticos (Gentamicina + Oxitetraciclina) generaron un halo de inhibición del crecimiento bacteriano de 1 cm de diámetro.

#### **Figura 16**

*Evaluación del efecto biocida de diferentes compuestos sobre el crecimiento de la cepa X. phaseoli* pv. *passiflorae* 16A



*Nota.* Medición del diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano en placas de AN. A) Estreptomicina, 200 ppm, B) sulfato de cobre, 0,4 g/L, C) Fosfitos, 8 cc/L, D) agua destilada estéril, E) solución de antibióticos (Gentamicina + Oxitetraciclina) 0,7 g/L, F) dióxido de cloro, 2 cc/L. *Fuente.* Autoría Propia.

De tal forma que se puede decir que se obtuvo una respuesta inhibitoria del crecimiento bacteriano de la cepa *X. phaseoli* pv. *passiflorae* 16A proveniente de gulupa, en un rango de concentraciones de solución de antibióticos (Gentamicina + Oxitetraciclina) desde 0,7 g/L hasta 0,8 g/L (Figura 16, E). Resultados similares de inhibición a los obtenidos en el tratamiento con la solución de antibióticos bajo condiciones *in vitro* han sido reportados por autores como López y Castaño (2011) a partir de aislamientos bacterianos de *Pseudomonas* spp. provenientes de cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). La misma solución de antibióticos (Gentamicina + Oxitetraciclina) disminuyó la población bacteriana de *Pseudomonas* sp. con un halo de inhibición del crecimiento bacteriano de 1,40 cm de diámetro incubado a 27 °C por 24 horas en dosis de 0,8 g/L. Así mismo, Trujillo (2020), obtuvo un halo de inhibición del crecimiento bacteriano de *Xanthomonas arbuticola* pv. *juglandis* de 1,46 cm diámetro, incubando a 28 °C por 48 horas en dosis de 0,6 g/L.

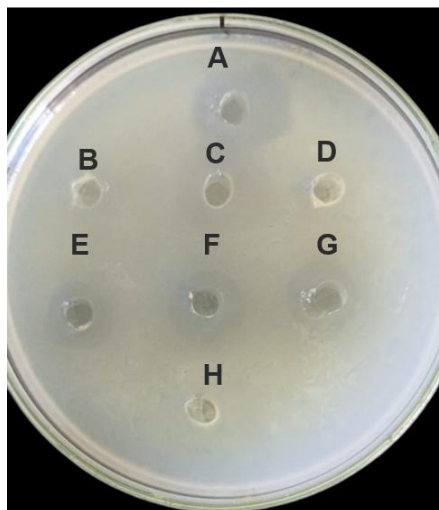
Los antibióticos utilizados en este estudio tienen como ingrediente activo Sulfato de gentamicina + Clorhidrato de oxitetraciclina, dos antibióticos generalmente usados para el control de bacterias fitopatógenas, de ahí su alta efectividad. Hinojosa (2017), reportó las propiedades antibióticas de Gentamicina + Oxitetraciclina, siendo inhibidor de crecimiento bacteriano al interferir en la síntesis de proteínas y como antibiótico bacteriostático actuando sinérgicamente. En campo cuando son aplicados, los antibióticos ingresan a la planta a través del xilema y posteriormente se da su paso hacia los órganos aéreos que son los más afectados por la

bacteria. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos de este ensayo realizado con el aislamiento de *X. axonopodis* proveniente de gulupa, la solución de antibióticos (Gentamicina + Oxitetraciclina) puede ser utilizado para el manejo de mancha aceitosa en campo a una concentración de 0,7 g/L (evaluada *in vitro*) (Figura 16, E) ya que al ser un producto sistémico puede ser utilizado con fines curativos (Edifarm, 2019), lo cual muestra el potencial para ser incorporado en estrategias de manejo de la mancha aceitosa de la gulupa en campo.

Para el caso del sulfato de cobre, los resultados obtenidos (Figura 17) son comparables a los reportados por Quezado et al. (2003), quien evaluó *in vitro* el sulfato de cobre obteniendo un efecto inhibitorio de *X. axonopodis* a partir de 0,2 g/L incubado a 28 °C por 48 horas, aunque fue una dosis un poco más baja a la evaluada en este estudio (0,7g/L) nuestros resultados son igualmente satisfactorios. Asimismo, Trujillo (2020) obtuvo con sulfato de cobre un control efectivo de la bacteria *X. arbuticola*, inhibiendo su crecimiento a 28 °C por 24 horas a una dosis de 1,20 g/L y Moya, et al. (2018) mencionan que el sulfato de cobre pentahidratado logró inhibir el crecimiento *in vitro* de aislamientos de *X. arbuticola* pv. *juglandis* a 25 °C en 48 horas, presentando más susceptibilidad a concentraciones cercanas a 1.18 g/L. Por lo tanto, considerando las concentraciones de sulfato de cobre efectivas reportadas para el control de diferentes especies de *Xanthomonas* y teniendo en cuenta la dosis encontrada como efectiva *in vitro* en este trabajo (Figura 17), se puede decir que concentraciones entre 0,7 g/L a 1,18 g/L podrían ser evaluadas en campo para el control de la mancha aceitosa en gulupa.

### Figura 17

*Halos de inhibición del crecimiento de la cepa X. phaseoli pv. passiflorae 16A*



*Nota.* Placas de AN expuesto a diferentes concentraciones de Sulfato de Cobre (B-G) A) estreptomicina, 200 ppm, B) 0,4 g/L, C) 0,5 g/L, D) 0,6 g/L, E) 0,7 g/L, F) 0,7.5 g/L, G) 0,8 g/L, H) agua destilada estéril. *Fuente.* Autoría propia

Se reporta que el cobre tiene un efecto bactericida al generar un daño en las membranas y en sus proteínas que inhiben su reproducción (Moya et al., 2018). Por lo tanto, este elemento puede ser utilizado para el control de manchas foliares generadas por bacterias como es el caso de la bacteriosis en gulupa. Al respecto, Montoya et al. (2013), reportó su uso para el control de bacteriosis en maracuyá ocasionadas por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* mediante la inmersión de plántulas hasta la raíz en una concentración de 1,2 g/L por 30 minutos, obteniendo una reducción considerable del porcentaje de la severidad en campo. Por lo tanto, puede ser usado como tratamiento preventivo al realizar la aplicación en las raíces antes de la aparición de la enfermedad.

Con respecto a los fosfitos, estos han sido utilizados para el manejo de diversas enfermedades en plantas ya sea de manera directa actuando sobre el patógeno o de manera

indirecta actuando como bioestimulantes, induciendo los mecanismos de defensa en las plantas aún en ausencia del patógeno (Eshraghi et al., 2011). El efecto directo puede explicarse ya que los fosfitos son derivados del ácido fosforoso, molécula que interrumpe el metabolismo del patógeno, generando una competencia en diversas rutas metabólicas como ATP, ADP y AMP (Díaz et al., 2011). Y el efecto indirecto de los fosfitos se fundamenta en que el fósforo en forma de ion fosfito causa una respuesta hipersensitiva en la planta activando respuestas de defensa que limitan el crecimiento del patógeno (Yáñez et al., 2018).

No obstante, el efecto directo de los fosfitos ha sido reportado principalmente como fungicida actuando sobre hongos patógenos inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación de esporas, y como bactericida afectando su estructura, crecimiento y reproducción (Yáñez et al., 2018). El mismo autor afirma que el efecto ha sido mejor como fungicida que bactericida, aunque los fosfitos se reportan como alternativa para el manejo de enfermedades, la eficacia de los fosfitos en el control de organismos fitoparásitos varían dependiendo del ión unido al fosfito, el método de aplicación, el organismo patógeno y la planta hospedante.

Por lo tanto, la ausencia de inhibición del crecimiento de la cepa *X. phaseoli* pv. *passiflorae* 16A obtenido en este trabajo, puede ser explicada por el tipo de evaluación directa que se hizo de los fosfitos sobre la bacteria en condiciones *in vitro*. Sin embargo, en campo posiblemente la acción de estos compuestos sea indirecta, actuando como inductor de resistencia en las plantas de gulupa al entrar en contacto con las células del tejido vegetal. Así mismo, es posible que esta respuesta de resistencia de la bacteria a los fosfitos *in vitro*, dependa de cambios a nivel genómico que influyan en la resistencia a este compuesto (Yáñez et al., 2018).

Con respecto a los resultados obtenidos con el dióxido de cloro, este compuesto tampoco generó inhibición de crecimiento bacteriano en el ensayo planteado (Figura 16, F). No obstante,

Singh (2002) menciona que el dióxido de cloro puede tener mínimas reducciones de las poblaciones bacterianas tanto a bajas (50 mg/L) como altas (200 mg/L) concentraciones con una eficacia limitada, de la cual puede tener una respuesta positiva tanto como negativa por parte del patógeno. Muñoz et al. (2013) menciona que las desventajas del compuesto se basan en su volatilidad y sensibilidad a la luz, lo cual puede incidir en el efecto del dióxido de cloro obtenidos en este ensayo.

Por otra parte, se han visto efectos positivos en otras bacterias como lo menciona Ramírez et al. (2014), quienes ejecutaron pruebas de inhibición *in vitro* de dióxido de cloro sobre *Dickeya* sp, obteniendo inhibición total de la bacteria, desde una concentración de 30 mg/L hasta 50 mg/L. Así mismo, se ha reportado un efecto bactericida del dióxido de cloro sobre *Ralstonia solanacearum* proveniente de cultivos de banano tanto en ensayos *in vitro* e *in planta* (Muñoz et al., 2013). Para el caso de enfermedades generadas por *X. campestris* pv. *vesicatoria* se ha demostrado que funciona como desinfectante en la corteza de la fruta.

El dióxido de cloro ha sido utilizado comúnmente en solución acuosa con una acción fungicida y bactericida a bajas concentraciones. Como bactericida, la molécula entra en contacto con la bacteria a bajas concentraciones, penetra a través de la membrana celular, inhibe su respiración, la síntesis de proteínas y su actividad enzimática desencadenando la muerte celular (Aurrecoechea et al., 2006). Se reporta que la aplicación de dióxido de cloro es eficaz ya que adicional a su acción directa sobre el patógeno, no genera residuo tóxico y es amigable con el ambiente, además de ser un producto económico, aportando a una producción rentable y libre de enfermedades (Muñoz, 2020).

Aunque en nuestro trabajo no se detectó un efecto sobre *X. phaseoli* pv. *passiflorae* posiblemente en campo la aplicación de fosfitos y dióxido de cloro como preventivo podría

actuar como inductor de resistencia sistémica previniendo la infección y multiplicación del patógeno.

## Conclusiones

La sintomatología asociada con la mancha aceitosa en gulupa se caracteriza por manchas necróticas de color pardo de bordes con aspecto aceitoso acompañados de clorosis que se expanden causando la manifestación de una mancha aceitosa sobre el tejido afectado.

El sulfato de cobre y antibióticos (Gentamicina + Oxitetraciclina) inhibieron efectivamente el crecimiento *X. phaseoli* pv. *passiflorae* en condiciones *in vitro* a una concentración de 0,7 g/L en ambos casos, siendo prometedores para el manejo de la bacteriosis en gulupa.

Mediante el uso de los marcadores MLSA se sugiere molecularmente que los aislamientos bacterianos obtenidos de cultivos de gulupa de Venecia con síntomas de mancha aceitosa, corresponden a *X. phaseoli* pv. *passiflorae*.

### **Perspectivas**

Asociar los resultados obtenidos en condiciones *in vitro* con los experimentos en campo utilizando los mismos productos evaluados para el control de la mancha aceitosa de la gulupa.

Utilizar un mayor número de marcadores MLSA e incluir en el análisis nuevas secuencias producto del proyecto de secuenciación del genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, que puede contribuir a la reclasificación de especies de *Xanthomonas*.

## Referencias Bibliográficas

Agronet. (2021). *Estadísticas*. Agronet.

<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1#>

Almeida, N., Yan, S., Cai, R., Clarke, C., Morris, C., Schaad, N. & Vinatzer, B. (2010). *PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes*. *Phytopathology*, 100(3), 208-215. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-3-0208>

Analdex. (2021). Asociación Nacional de Comercio Exterior. *Exportación de gulupa en 2020*. Analdex. <https://www.analdex.org/2021/02/25/exportacion-de-gulupa-en-2020/>

Aurrecoechea, I., Montelongo, M. & Rauduviniche, L. (2006). *Efectividad de distintos desinfectantes en la sobrevivencia de Xanthomonas axonopodis pv. citri sobre frutos de limón (Citrus limon) inoculados artificialmente* [tesis de grado, Universidad de la republica]. Repositorio Institucional Universidad de la Republica. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/25491/1/AurrecoecheaAldabaldeIn%C3%A9sde.pdf>

Barghouthi, S. (2011). *A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers*. *Indian journal of microbiology*, 51, 430-444. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0122-5>

Benítez, S. & Hoyos, L. (2009). *Sintomatología asociada a bacteriosis en zonas productoras de gulupa (Passiflora edulis Sims.) en Colombia*. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(2), 275–279. <https://doi.org/10.17584/rcch.2009v3i2.1218>

Benítez, S. (2010). *Caracterización del agente etiológico de la enfermedad denominada “mancha de aceite” en cultivos de gulupa (Passiflora edulis Sims) en zonas productoras de Colombia*. [tesis de maestría, Posgrado Interfacultades de Microbiología. Facultad de Ciencias. Instituto de Bio-

tecnología. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, Colombia]. Repositorio UNAL.

<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/6844>

Benítez, S., de León, W., Farfán, L., Castillo, S. & Hoyos, L. (2011). *Proceso infectivo de la mancha de aceite causada por Xanthomonas axonopodis EN GULUPA (Passiflora edulis Sims)*. *Revista de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines* “Ascolfi, 35(1), 72.

[https://www.researchgate.net/publication/250310317\\_PROCESO\\_INFECTIVO\\_DE\\_LA\\_MANCHA\\_DE\\_ACEITE\\_CAUSADA\\_POR\\_Xanthomonas\\_axonopodis\\_EN\\_GULUPA\\_Passiflora\\_edulis\\_Sims](https://www.researchgate.net/publication/250310317_PROCESO_INFECTIVO_DE_LA_MANCHA_DE_ACEITE_CAUSADA_POR_Xanthomonas_axonopodis_EN_GULUPA_Passiflora_edulis_Sims)

Bernal, C. (2022). *La gulupa ya es la tercera fruta que más exporta Colombia*. Forbes Colombia.

<https://forbes.co/2022/05/13/actualidad/la-gulupa-ya-es-la-tercera-fruta-que-mas-exporta-colombia>

Botero, M., Ramírez, M. & Castaño, J. (1998). *Identificación y caracterización de bacterias asociadas con enfermedades en maracuyá (Passiflora edulis var. flavicarpa degener), en dos zonas productoras del departamento de Caldas*. *Fitopatología Colombiana*. 21(2): 79-88.

<https://accefyn.metabiblioteca.org/cgi-bin/koha/opac-MARCdetail.pl?biblionumber=8913>

Cardona, D., Restrepo, A., Higuera, M., Gallo, Y., Marin, M. & Gutiérrez, P. (2022). *Natural infection of purple passion fruit (Passiflora edulis f. edulis) by a novel member of the family Tymoviridae in Colombia*. *Acta virologica*, 66(3).

<https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Agcd%3A16%3A704016/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Ascholar&id=ebsco%3Agcd%3A160032506&crl=c>

Castañeda, L. (2005). *Identification and characterization of genes unique to systemic Xanthomonas pathogens*. *Requirements for the degree of Doctor of philosophy*. [Doctoral dissertation].

Repository University of Florida. <https://typeset.io/pdf/identification-and-characterization-of-genes-unique-to-5etg59ndde.pdf>

Castillo, C. (2014). *Estrategias de Manejo de la Roña Cladosporium cladosporioides (FRESEN) GA de VRIES de la Gulupa Passiflora edulis f. edulis Sims* [tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, Colombia]. Repositorio UNAL.

<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/28878>

Castillo, N. & Granada, G. (1995). *Estudios sobre la bacteriosis en maracuyá en el Valle del Cauca: etiología, hospederos y control. Fitopat. Col*, 19(1), 55-61.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000077&pid=S2011-2173201400010000300006&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000077&pid=S2011-2173201400010000300006&lng=en)

Constantin, E., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van, C., De Vos, P. & Cottyn, B. (2016). *Genetic characterization of strains named as Xanthomonas axonopodis pv. Dieffenbachiae leads to a taxonomic revision of the X. axonopodis species complex. Plant Pathology*, 65(5), 792–806.

<https://doi.org/10.1111/ppa.12461>

Díaz, M., Arbeláez, J., Herrera, G. & Ariza, W. (2011). *Importancia de la nutrición mineral balanceada en los cultivos*, “clave en el manejo fitosanitario. Agrosavia.

<https://www.researchgate.net/profile/Mauricio-Oliveros->

[Diaz/publication/260202092\\_IMPORTANCIA\\_DE\\_LA\\_NUTRICION\\_MINERAL\\_BALANCEADA\\_EN\\_LOS\\_CULTIVOS\\_CLAVE\\_EN\\_EL\\_MANEJO\\_FITOSANITARIO/links/0046353022cde50f51000000/IMPORTANCIA-DE-LA-NUTRICION-MINERAL-BALANCEADA-EN-LOS-CULTIVOS-CLAVE-EN-EL-MANEJO-FITOSANITARIO.pdf](https://www.researchgate.net/publication/260202092_IMPORTANCIA_DE_LA_NUTRICION_MINERAL_BALANCEADA_EN_LOS_CULTIVOS_CLAVE_EN_EL_MANEJO_FITOSANITARIO/links/0046353022cde50f51000000/IMPORTANCIA-DE-LA-NUTRICION-MINERAL-BALANCEADA-EN-LOS-CULTIVOS-CLAVE-EN-EL-MANEJO-FITOSANITARIO.pdf)

Edifarm. (2019). Agrygent. *Bactericida sistémico*. Edifarm.

[https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm\\_quickagro/pdfs/productos/AGRY%20GENT-20191022-125620.pdf](https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/AGRY%20GENT-20191022-125620.pdf)

Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., McComb, J., Shearer, B. & Hardy, G. (2014). *Defence signalling pathways involved in plant resistance and phosphite-mediated control of Phytophthora cinnamomi*. *Plant molecular biology reporter*, 32(2), pp. 342-356.

<https://doi.org/10.1007/s11105-013-0645-5>

Farfán, L., Benitez, S., Hoyos, L. 2014. *Sensibilidad de bacterias procedentes de pasifloras a antibióticos y productos cúpricos*. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 8 (1): 20-33.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S2011-21732014000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S2011-21732014000100003&script=sci_arttext)

Fischer, G., Casierra, F. & Piedrahíta, W. (2009). *Ecofisiología de las especies pasifloráceas cultivadas en Colombia. Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba*. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá, 45-68.

[https://www.researchgate.net/publication/215793346\\_Ecofisiologia\\_de\\_las\\_especies\\_pasifloraceas\\_cultivadas\\_en\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/215793346_Ecofisiologia_de_las_especies_pasifloraceas_cultivadas_en_Colombia)

Florez, A., González, A., Pedroza, C., Correa, E., Rueda, N. & Orduz, S. (2014). *Identification, cloning and lactonase activity of recombinant protein of N-acyl homoserine lactonase (AiiA) from Bacillus thuringiensis 147-115-16 strain*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 16(1):153-162.

<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/73633>

García, M. (2002). *El cultivo del maracuyá*. Centa.

<http://www.centa.gob.sv/html/ciencia/frutales/maracuya>

- Gonçalves, E & Rosato, Y. (2000) *Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (Passiflora spp.) and their relatedness to different Xanthomonas species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 811–821. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-811>
- Guerrero, E., Velandia, L., Sanabria, N. & Hoyos, L. (2010). *Manejo integrado de la bacteriosis causada por Xanthomonas axonopodis en el cultivo de gulupa (Passiflora edulis Sims.). In Primer Congreso Latinoamericano de Passiflora (p. 90).*  
[https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/54459195/GULIPA-libre.pdf?1505705047=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DGULIPA.pdf&Expires=1713242756&Signature=SPwjOXHbpqurAku6yJ8mVuTUEi2N5MLu291faj-RH7OwGS~yXgMCt3vKoW1yLIRcy0usje9RQr3yKTeorrZC1yUzDkr1x~DPCPg0eBBYyKLVbdOHdLR0WXrhjZ6ebh3ZA1CAyBhiLk4LhRBFMcj6AsAI4ZFQvnqArjy4hEeNjk5n0zF8voi0lZXLtErAASDWx7KFItnKCWxfg7phGV7998u6xGfiJK6fOxAtW2sbAi7XpVgq62Be4VW62QDnx97MDxCnasm3iKnN6CQHFGmJvbKrob54uu7Zbtejf8MOogxv7YN2QeoygrdGuz-40NcH0fAVloxQNRebY8I4-Q4zw\\_\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=97](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/54459195/GULIPA-libre.pdf?1505705047=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DGULIPA.pdf&Expires=1713242756&Signature=SPwjOXHbpqurAku6yJ8mVuTUEi2N5MLu291faj-RH7OwGS~yXgMCt3vKoW1yLIRcy0usje9RQr3yKTeorrZC1yUzDkr1x~DPCPg0eBBYyKLVbdOHdLR0WXrhjZ6ebh3ZA1CAyBhiLk4LhRBFMcj6AsAI4ZFQvnqArjy4hEeNjk5n0zF8voi0lZXLtErAASDWx7KFItnKCWxfg7phGV7998u6xGfiJK6fOxAtW2sbAi7XpVgq62Be4VW62QDnx97MDxCnasm3iKnN6CQHFGmJvbKrob54uu7Zbtejf8MOogxv7YN2QeoygrdGuz-40NcH0fAVloxQNRebY8I4-Q4zw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=97)
- Harrison, J., Hussain, R., Aspin, A., Grant, M., Vicente, J., & Studholme, D. (2023). *Phylogenomic Analysis Supports the Transfer of 20 Pathovars from Xanthomonas campestris into Xanthomonas euvesicatoria. Taxonomy*, 3(1), 29-45. <https://doi.org/10.3390/taxonomy3010003>
- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. & Moore E.R.B. (1997). *Comparison of 16s Ribosomal DNA sequences of all Xanthomonas species. International Journal Systematic Bacteriology*. 47(2)328-335. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-328>
- Hernández, L., Castillo, F., Ocampo, J. & Wyckhuys, K. (2011). *Guía de identificación de plagas y enfermedades para la Maracuyá, la Gulupa y la Granadilla. Editorial Tadeo Lozano.*

<https://www.utadeo.edu.co/es/publicacion/libro/editorial/235/guia-de-identificacion-de-plagas-y-enfermedades-para-la-maracuya-la-gulupa-y-la-granadilla>

Hinojosa, F. (2017). *Eficacia de antibióticos en el control del tizón bacteriano (*Xanthomonas spp*) en dos variedades de fresa (*Fragaria x ananassa*, D). En la zona de San Rafael, Cantón Otavalo, Provincia Imbabura* (Bachelor's thesis, El Ángel: 2017).

<http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/3199>

Hoyos, L. (2010). *Enfermedades En Pasifloráceas*. Memorias Primer Congreso Latinoamericano De Pasifloras. Corporación Centro De Investigaciones Para La Transferencia Tecnológica De Pasifloras Del Departamento Del Huila, Cepass. Neiva, Huila. 115 P.

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189510/1/Libro-memorias-III-Congreso-Latinoamericano-y-I-Congreso-Mundial-de-Pasifloras-2017.pdf>

Instituto de Ciencias Naturales (ICN). Universidad Nacional de Colombia: Colecciones. (2012). Unal.

<http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/80343/>

Jaramillo, H., Marín, M. & Gutiérrez, P. (2018). *Molecular characterization of Soybean mosaic virus (SMV) infecting Purple passion fruit (*Passiflora edulis f. edulis*) in Antioquia, Colombia*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 51, 617–636. <https://doi.org/10.51372/bioagro342.3>

Jaramillo, H., Marín, M. & Gutiérrez, P. (2019). *Complete genome sequence of a Passion fruit yellow mosaic virus (PFYMV) isolate infecting purple passion fruit (*Passiflora edulis f. edulis*)*. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 72, 8643–8654. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n1.69438>

Jiménez, Y., Carranza, C. & Rodríguez, M. (2012). *Gulupa (*Passiflora Edulis sims*)*. En G. Fischer, *Manual para el cultivo de frutales en el trópico* (págs. 579-599). Bogotá: Produmedios.

<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79864>

- Koblitz, J., Halama, P., Spring, S., Thiel, V., Baschien, C., Hahnke, R. & Reimer, L. (2023). *Media Dive: the expert-curated cultivation media database*. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1531-D1538. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac803>
- López, N. & Castaño, J. (2011). *In vitro evaluation of the efficacy of bactericides on Pseudomonas sp. Migula, causal agent of die back in tomato tree [Solanum betaceum (cav.) Sendt.]*. *Agronomía*, 19(1), 31-41.  
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20133297541>
- Mhedbi, N., Hajri, A., Boureau, T., Darrasse, A., Durand, K., Brin, C. & Jacques, M. A. (2013). *Evolutionary history of the plant pathogenic bacterium Xanthomonas axonopodis*. *Plos one*, 8(3), e58474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058474>
- Midha, S. & Patil, P. (2014). *Genomic insights into evolutionary origin of Xanthomonas 1 axonopodis pv. citri and its ecological relatives* Corresponding author: Prabhu B Patil *Genomic insights into evolutionary origin of Xanthomonas*. *Appl. Environ. Microbiol*, 80(20), 6266–6279.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01654-14>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2021). *Área, Producción y Rendimiento Nacional por Cultivo/Gulupa*. Minagricultura. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2021-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Montoya, C., Castaño, J. & Villegas, B. (2013). *Evaluación de alternativas de manejo de la bacteriosis del maracuyá*. *Acta Agronómica*, 21(2), 40-50.  
[https://www.researchgate.net/publication/335854003\\_EVALUACION\\_DE\\_ALTERNATIVAS\\_DE\\_MANEJO\\_DE\\_LA\\_BACTERIOSIS\\_DEL\\_MARACUYAEVALUATION\\_OF\\_ALTERNATIVES\\_TO\\_PASSION\\_FRUIT\\_BACTERIOSE\\_MANAGEMENT](https://www.researchgate.net/publication/335854003_EVALUACION_DE_ALTERNATIVAS_DE_MANEJO_DE_LA_BACTERIOSIS_DEL_MARACUYAEVALUATION_OF_ALTERNATIVES_TO_PASSION_FRUIT_BACTERIOSE_MANAGEMENT)

Mora, R., Benítez, E. & García, C. (2009). *Desarrollo espacio-temporal de enfermedades de gulupa*. In: *Seminario de Investigación Enfermedades de la gulupa (Passiflora edulis)*. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Bogotá. Noviembre 23 y 26.

Moya, E., Auil, P., Oyarzúa, P. & Gerding, M. (2018). *Resistencia al ión cobre de Xanthomonas arboricola pv. juglandis en nocedales de la región del biobío*. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 34(1), 3-11. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902018005000201>

Muñoz, A. (2020). *Efecto del dióxido de cloro en la prevención de Mycosphaerella musicola L. y Erwinia carotovora, en plátano (musa paradisiaca. l.)* [tesis doctoral, universidad agraria del ecuador] Repositorio Universidad Agraria del ecuador.  
<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/MU%C3%91OZ%20VIZHCO%20DANNY%20ALEX.pdf>

Muñoz, M., Morales, J. & Ramírez, J. (2013). *Dióxido de cloro e inductores de resistencia como alternativas de manejo del Moko (R. solanacearum) en Banano (Musa sp.)*. XXXI Congreso Colombiano de Fitopatología, Pereira Colombia. *Ascolfi*, p 21.  
<https://doi.org/10.15517/rac.v38i2.17277>

NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2023). Nih.gov. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Ocampo, J. & Wyckhuys, K. (2010). *Mejoramiento genético participativo de la granadilla (Passiflora ligularis Juss.) en Colombia*. Memorias Primer Congreso Latinoamericano de Passiflora. Neiva, Huila. <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/54459195/GULIPA-libre.pdf?1505705047=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DGULIPA.pdf&Expires=1713244162&Signature=FmESAqyjTuJ-6ImuYFhtWUFcXkfqbE6v7ZQ6cNcxKdUFUm84-o0f1HPCuZ7OzXYx75rBEIIWCdStVyoZGeZILlyuI5h1C4tBmHPqcBKkzaCo21EDdvtSu3wCwu->

gEldbLg6heBK4QspAahWkcnD5hEQst5wspSOVfQI~NlNjY3jmQ0sXe~pC2aX27rQTBvKBO  
 PsYHj8Ita0zbyQqpgIjmRQJn2XXe-  
 OrS9c4u1ve2p2LtFw90HfJvsz0tN2RLUvWLkzRb7Ck~m2WMLT3NtYmlE5D7ohgzushhPN  
 6N2nAzRp~H-kHzx3ZC1UcPrh9SMb32ibYz6cXM5Ua0CZfu-Rw\_\_&Key-Pair-  
 Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=10

Ocampo, J. & Wyckhuys, K. (2012). *Tecnología para el cultivo de la gulupa (Passiflora edulis f. edulis Sims) en Colombia*. Centro de Bio-Sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT y Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, República de Colombia. Bogotá, 68 páginas.

[https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/wysiwyg/pub\\_52\\_tecnologia\\_para\\_el\\_cultivo\\_de\\_la\\_gulupa.pdf](https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/wysiwyg/pub_52_tecnologia_para_el_cultivo_de_la_gulupa.pdf)

Orjuela, N., Campos, S., Sánchez, J., Melgarejo, L. & Hernández, M. (2011). *Manual de manejo poscosecha de la gulupa (Passiflora edulis Sims)*. Poscosecha de la gulupa (*Passiflora edulis Sims*). Universidad Nacional de Colombia, 7-22. [https://www.researchgate.net/profile/Maria-Hernandez-](https://www.researchgate.net/profile/Maria-Hernandez-101/publication/260320867_MANUAL_DE_MANEJO_POSCOSECHA_DE_LA_GULUPA_Passiflora_edulis_Sims/links/546f8e580cf24af340c090e3/MANUAL-DE-MANEJO-POSCOSECHA-DE-LA-GULUPA-Passiflora-edulis-Sims.pdf)

[101/publication/260320867\\_MANUAL\\_DE\\_MANEJO\\_POSCOSECHA\\_DE\\_LA\\_GULUPA\\_Passiflora\\_edulis\\_Sims/links/546f8e580cf24af340c090e3/MANUAL-DE-MANEJO-POSCOSECHA-DE-LA-GULUPA-Passiflora-edulis-Sims.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Maria-Hernandez-101/publication/260320867_MANUAL_DE_MANEJO_POSCOSECHA_DE_LA_GULUPA_Passiflora_edulis_Sims/links/546f8e580cf24af340c090e3/MANUAL-DE-MANEJO-POSCOSECHA-DE-LA-GULUPA-Passiflora-edulis-Sims.pdf)

Ortiz, E. & Hoyos, L. (2012). *Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (Passiflora edulis Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia)*. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(1), 110-116.

<https://doi.org/10.17584/rcch.2012v6i1.1277>

- Ortiz, E., León, J., Rivero, R., Hoyos, L. (2011) *Manual de prácticas de fitopatología general*. Facultad de agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.
- Pachón, A., Montaña, A. & Fischer, G. (2006). *Efecto del empaque, encerado y temperatura sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de la gulupa (Passiflora edulis f. edulis) en postcosecha*. pp. 72-78. En: Salamanca, G. (ed.). *Propiedades fisicoquímicas y sistemas de procesado: Productos hortofrutícolas en el desarrollo agroalimentario*. Editora Guadalupe, Bogotá. 350 p.
- [https://www.researchgate.net/publication/256702576\\_Efecto\\_del\\_empaque\\_encerado\\_y\\_temperatura\\_sobre\\_las\\_caracteristicas\\_fisicoquimicas\\_y\\_organolepticas\\_de\\_la\\_gulupa\\_Passiflora\\_edulis\\_f\\_edulis\\_en\\_postcosecha](https://www.researchgate.net/publication/256702576_Efecto_del_empaque_encerado_y_temperatura_sobre_las_caracteristicas_fisicoquimicas_y_organolepticas_de_la_gulupa_Passiflora_edulis_f_edulis_en_postcosecha)
- Pereira, A. (1969). *Uma nova doença bacteriana do maracujá (Passiflora edulis, Sims) causada por Xanthomonas passiflorae n. sp.* Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 36, 163-174.
- <https://www.scienceopen.com/document?vid=7f05e465-2d38-4a23-93cc-ff01a0cf6f5c>
- Pérez, J. & Liscano, G. (2012). Aspectos generales de la Gulupa. Tecnología para el cultivo de la Gulupa en Colombia, 7. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19648>
- Popović, T., Mitrović, P., Jelušić, A., Dimkić, I., Marjanović, A., Nikolić, I. & Stanković, S. (2019). *Genetic diversity and virulence of Xanthomonas campestris pv. campestris isolates from Brassica napus and six Brassica oleracea crops in Serbia*. *Plant Pathology*, 68(8), 1448-1457.
- <https://doi.org/10.1111/ppa.13064>
- Promega. (2019). *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Promega.
- <https://worldwide.promega.com/es-es/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/wizard-genomic-dna-purification-kit/?catNum=A1120#protocols>



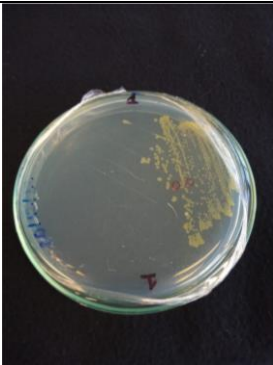


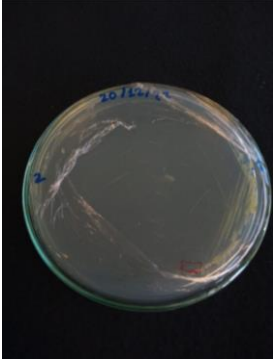


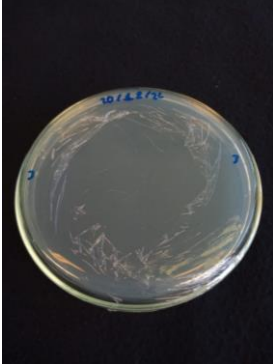
- Quezado, A., Gazzoto, A., Leite, R. & Camargo, L. (2003). *Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em Xanthomonas spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. Horticultura Brasileira*, 21, 670-675. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400020>
- Ramírez, G., Jaraba, B. & Buriticá, P. (2014). *Manejo de la pudrición acuosa del pseudo-tallo (Dickeya sp.) en banano (Musa sp.) bajo condiciones de invernadero. Agronomía Costarricense*, 38(2), 83-92. <https://doi.org/10.15517/rac.v38i2.17277>
- Ramírez, J., Tamayo, P. & Morales, J. (2017). *Identification and pathogenicity of microorganisms affecting purple passion fruit in Colombia. Revista Ceres*, 64, 250-257.
- Riascos, D. (2011). *Caracterización etiológica de la Roña de la gulupa (Passiflora edulis Sims.) en la región del Sumapaz (Cundinamarca)* [tesis magister, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/9360>
- Riascos, D., Quiroga, I., Gómez, R. & Hoyos, L. (2012) *Cladosporium: Causal agent of scab in purple passion fruit or gulupa (Passiflora edulis Sims.). Agricultural Sciences*, 3, 299-305. <http://agriperfiles.agri-d.net/individual/n126173>
- Rodríguez, E., Bermeo, P., Segura, J. & Parra, E. (2022). *Caracterización y tipificación de los sistemas de producción de gulupa (Passiflora edulis f. edulis Sims) de las regiones Norte y Centro - Occidente de Tolima. Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 13(1), 89 – 107. <https://doi.org/10.22490/21456453.4583>
- Ruz, L., Moragrega, C. & Montesinos, E. (2008). *Evaluation of four whole-plant inoculation methods to analyze the pathogenicity of Erwinia amylovora under quarantine conditions. International Microbiology*.11:111-119. <https://revistes.iec.cat/index.php/IM/index>

- Schaad, N. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Department of Plant Pathology. University of Georgia. St. Paul (Minnesota). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>
- Singh, N., Singh, R., Bhunia, A. & Stroshine, R. (2002). *Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing Escherichia coli O157: H7 on lettuce and baby carrots*. LWT, 35(8), 720-729. <https://doi.org/10.3390/foods10030574>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4. *Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular biology and evolution, 24(8), 1596-1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Trujillo, D. (2020). *Prueba de eficacia in vitro de Pseudomonas syringae pv. syringae y Xanthomonas arboricola pv. juglandis sometida a diferentes tratamientos*. Laboratorio Agrícola de Chile. <https://ceresearch.com/aliquet-lectus-proin-nibhnisl-condimentum-dvenenatis-condimentum/>
- Uribe, C. (2017). *Identificación y caracterización de fitopatógenos asociados al cultivo de gulupa (Passiflora edulis f. edulis Sims) en el departamento de Antioquia*. Universidad Nacional de Colombia. [tesis magister, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio UNAL. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80492/1026131141.2017.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Villegas, B., Ocampo, J. & Castillo, C. (2012). *Principales enfermedades en el cultivo de Gulupa y su manejo*. Tecnología para el cultivo de la Gulupa en Colombia, 54. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19654>
- Yáñez, M., López, C., Ayala, F., Partida, L., Velázquez, T. & Medina, R. (2018). *Los fosfitos como alternativa para el manejo de problemas fitopatológicos*. Revista mexicana de fitopatología, 36(1), 79-94. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-7>

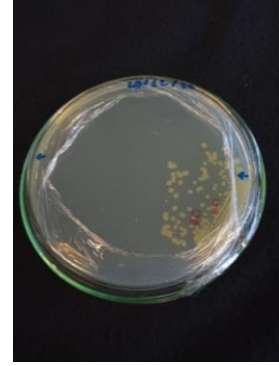
## Apéndice

## Apéndice A

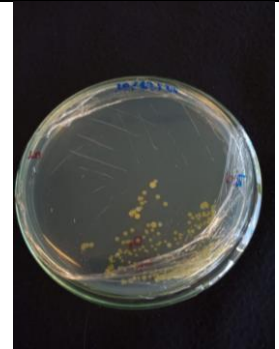
*Registro fotográfico del material vegetal muestreado y de los aislamientos bacterianos obtenidos.*

Código	Muestreo en campo	Fotos de recolección	Fotos en Caja
1			
2			
23			

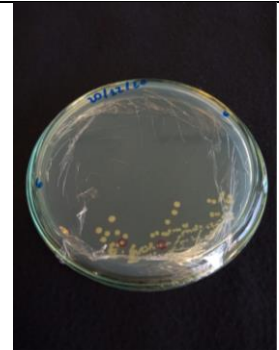
4A



5



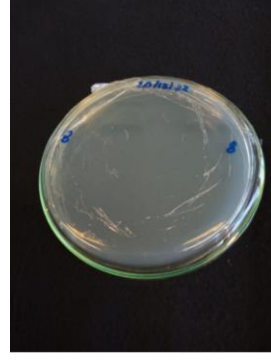
6



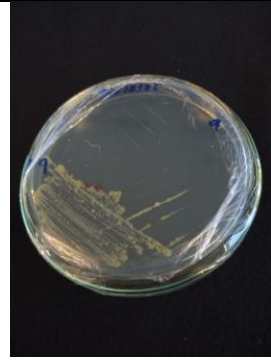
7B



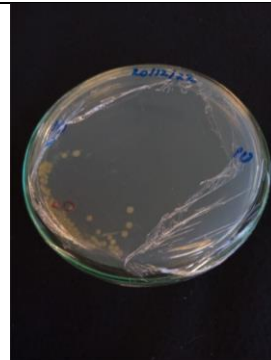
8



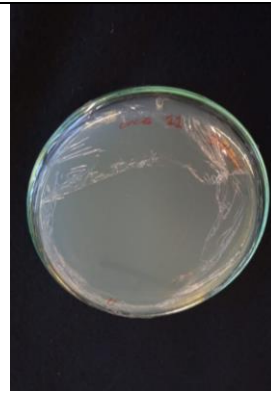
9



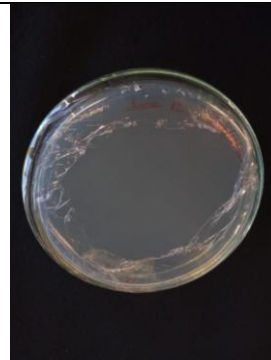
10



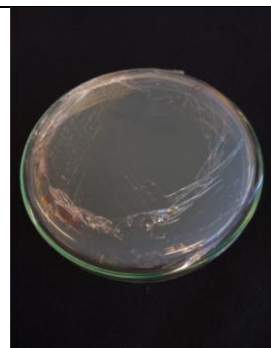
11



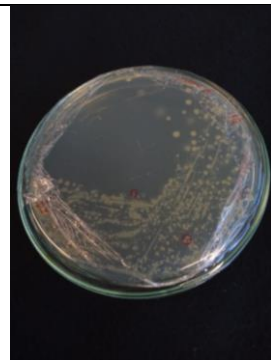
12



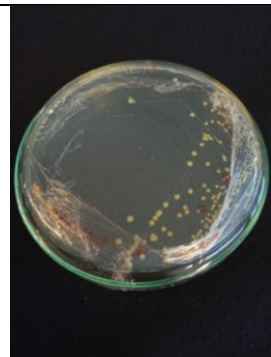
13



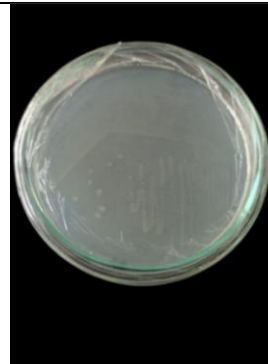
14



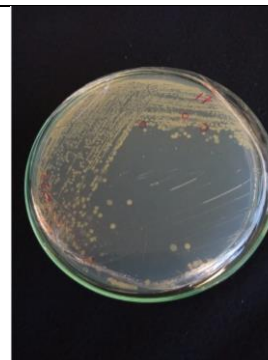
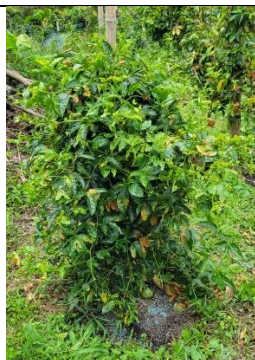
15



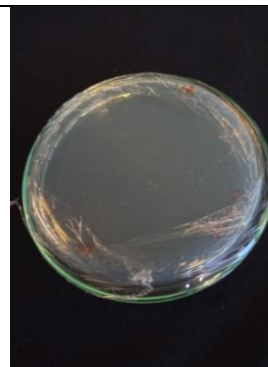
16A



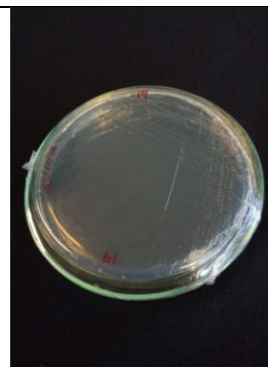
17



18

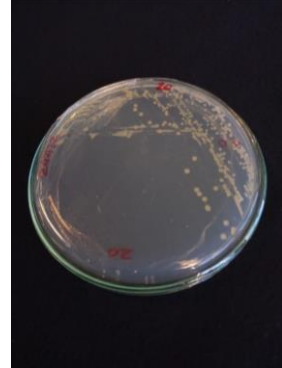


19



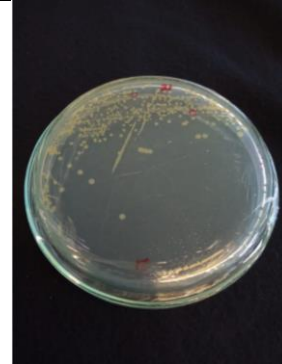
---

20



---

21



---