

**Caracterización preliminar del agente causal de la pudrición vascular en cultivos de papayuela (*Vasconcellea pubescens* A.DC.) en cuatro municipios de Boyacá**

**Andrea Enríquez Rodríguez**

**Asesor**

**Jorge Armando Fonseca Carreño**

**Ingeniero agrónomo Esp., Msc., Doctor (c)**

**Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD**

**Escuela de Ciencia Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente - ECAMPA**

**Especialización en Biotecnología Agroambiental**

**2024**

## **Dedicatoria**

*A los agricultores que trabajan en nuestros suelos y proveen con esfuerzo los alimentos, para aportarles un granito de arena a la resolución de la problemática en sus cultivos.*

## **Agradecimientos**

A Dios Todopoderoso por darme el regalo de seguir estudiando y aprendiendo del magnífico mundo microscópico.

A la Universidad Nacional abierta y a Distancia por la formación académica, facilitar el laboratorio y recursos para el desarrollo de esta investigación.

A la gobernación de Boyacá, Secretaría de Agricultura y ASOHOFRUCOL por la financiación del proyecto.

A la Ing. Mónica Patiño P. por la oportunidad, la enseñanza y apoyo en la fase de laboratorio, al Ing. Jorge Armando Fonseca C. por su excelente dirección y asesoría, el tiempo dedicado, por compartir su conocimiento, su valiosa gestión administrativa, logística de traslados y disposición del laboratorio donde se desarrolló este proyecto, a ellos gracias por su valiosa amistad, patrocinio e inestimable apoyo durante esta etapa.

A mi esposo Andrés Luque y a mis hijas Juliana e Izabela por regalarme su tiempo y paciencia para desarrollar este trabajo de investigación lejos de casa.

A la profesora de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNAL), Adriana González Almario por sus aportes a la investigación. A la Dra. Martha Riveros, Dra. Pilar Amézquita, Dra. Sofía Gómez y Dra. Adriana Aranda por sus aportes de algunos reactivos a la investigación.

A todas las personas que nos colaboraron con sus palabras y tiempo para poder alcanzar este logro: evaluador UNAD escuela ECAPMA profesora Johana Madroñero, profesor Juan Camilo Álvarez (jurado), dra. Nataly Zamora Vacca, Líder Especialización en Biotecnología Agroambiental y todo el personal asociado a los laboratorios de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD Sede en Tunja Boyacá.

*Mil gracias*

## Resumen

Actualmente, en cultivos comerciales de papayuela (*Vasconcellea pubescens* A. DC.) en el departamento de Boyacá, se ha registrado una nueva enfermedad que se manifiesta por marchitamientos de las hojas, pudrición del tallo y en poco tiempo muerte de la planta, generando reducción de la producción y baja rentabilidad. Para encontrar estrategias de manejo del problema, se planteó esta investigación con el objetivo de caracterizar el agente causal de la enfermedad de este cultivo en cuatro municipios de Boyacá. El proyecto empezó con la colecta de muestras de tallos y de exudados de los tallos de plantas afectadas en los municipios de Ramiriquí, Sotaquirá, Maripí y Cómbita. Luego en el laboratorio se realizó el aislamiento de los microorganismos en medios selectivos y nutritivos, posteriormente se efectuaron pruebas enzimáticas *in vitro* donde se determinó la capacidad enzimática de los aislamientos en degradar lignina (AL) y celulosa (CMC) en medios de cultivo con estos componentes. En AL se midió el crecimiento en milímetros, en CMC se midió el crecimiento y el halo de degradación de celulosa. Finalmente las bacterias se identificaron con pruebas bioquímicas y fisiológicas, los hongos, mediante claves taxonómicas. Los resultados muestran que de los aislamientos se obtuvieron 4 hongos y 17 bacterias. A partir de las pruebas enzimáticas se seleccionaron 4 hongos codificados como PRaCH, PSoCH, PMaCH, PCTD y cinco bacilos Gram negativos codificados como PMaMT2, PMaDT2, PCED y PCET por tener marcada actividad enzimática ligninolítica. Se concluye que a partir de las pruebas enzimáticas se clasificaron los microorganismos aislados según la capacidad de degradar compuestos como la lignina, también se identificó hongos del género *Fusarium* y en bacterias se descartaron patógenos de los géneros *Xanthomonas*, *Erwinia* y *Pseudomonas*.

**Palabras clave:** Papayuela, marchitez vascular, aislamiento de fitopatógenos, *Fusarium*.

## Abstract

Currently, in commercial crops of papayuela (*Vasconcellea pubescens* A. DC.) in the department of Boyacá, a new disease has been recorded that is manifested by wilting of the leaves, rotting of the stem and in a short time the death of the plant, generating reduction of production and low profitability. To find strategies to manage the problem, this research was proposed with the objective of characterizing the causal agent of the disease of this crop in four municipalities of Boyacá. The project began with the collection of samples of stems and exudates from the stems of affected plants in the municipalities of Ramiriquí, Sotaquirá, Maripí and Cómbita. Then, in the laboratory, the isolation of the microorganisms was carried out in selective and nutritional media. Subsequently, in vitro enzymatic tests were carried out where the enzymatic capacity of the isolates to degrade lignin (AL) and cellulose (CMC) in culture media with these components was determined. In AL, growth was measured in millimeters, in CMC, growth and the cellulose degradation halo were measured. Finally, the bacteria were identified with biochemical and physiological tests, the fungi, using taxonomic keys. The results show that 4 fungi and 17 bacteria were obtained from the isolates. From the enzymatic tests, 4 fungi coded as PRaCH, PSoCH, PMaCH, PCTD and five Gram-negative bacilli coded as PMaMT2, PMaDT2, PCED and PCET were selected for having marked ligninolytic enzymatic activity. It is concluded that from the enzymatic tests the isolated microorganisms were classified according to the ability to degrade compounds such as lignin, fungi of the *Fusarium* genus were also identified and pathogens of the genera *Xanthomonas*, *Erwinia* and *Pseudomonas* were ruled out in bacteria.

**Keywords:** Papayuela, vascular wilt, isolation of phytopathogens, *Fusarium*.

## Contenido

Agradecimientos	3
Resumen	4
Abstract	5
Lista de Tablas	9
Lista de Figuras	10
Lista de Graficas	12
Introducción	13
Justificación	15
Objetivos	16
Marco Conceptual	17
1.1 Generalidades de la Papayuela ( <i>Vasconcellea pubescens</i> A.DC.)	17
1.2 Morfología de la planta	19
1.3 Importancia económica ecosistémica y cultural del cultivo	20
1.4 Producción y Rendimiento en Colombia	22
1.5 Enfermedades del cultivo	23
Marchitez vascular	25
1.6 Detección de fitopatógenos	30
Metodología	32
2.1 Zonas de Estudio	32
2.2 Muestreos	34
2.3 Lugar de procesamiento	35

2.4 Aislamiento de Posibles Microorganismos Patógenos a Partir de Estructuras Vegetativas de Papayuela Afectadas por la Enfermedad.	36
2.4.1 Hongos	36
2.4.2 Bacterias	38
2.5 Clasificación de los Aislamientos Según su Actividad Enzimática en Medios de Cultivo con Lignina y Celulosa.	39
2.6 Diseño experimental y Análisis Estadístico	41
2.7 Identificación Morfológica y Bioquímica de los Microorganismos Seleccionados.	42
2.7.1 Hongos	42
2.7.2 Bacterias	44
Resultados	44
3.1 Aislamientos Microbianos	44
3.2 Clasificación de los Aislamientos Según su Actividad Enzimática en Medios de Cultivo con Lignina y Celulosa.	48
3.2.1 Evaluación en agar Lignina	48
3.2.1.1 Actividad Ligninolítica Bacteriana	48
3.2.1.2 Actividad Ligninolítica Hongos	52
3.3.2 Evaluación en agar Celulosa	55
3.3.2.1 Actividad Celulolítica Bacteriana	55
3.3.2.2 Actividad Celulolítica Hongos	57
4.1 Identificación Morfológica y Bioquímica	58
4.1.1 Bacterias	58
4.1.2 Hongos	63

Discusión	71
Conclusiones	77
Recomendaciones	78
Anexo 1	79
Anexo 2	80
Anexo 3	82
Anexo 4	83
Bibliografía	99

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b>	Resumen de los aislamientos bacterianos	45
<b>Tabla 2.</b>	Resumen de los aislamientos fúngicos	47
<b>Tabla 3.</b>	Crecimiento de bacterias en agar lignina	51
<b>Tabla 4.</b>	Crecimiento fúngico en agar lignina	54
<b>Tabla 5.</b>	Crecimiento de bacterias en agar celulosa	56
<b>Tabla 6.</b>	Crecimiento fúngico en agar celulosa	58
<b>Tabla 7.</b>	Resumen pruebas de selección bioquímicas de bacterias	63
<b>Tabla 8.</b>	Resumen de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de hongos	70

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Distribución mundial de papayuela nativa e introducida	18
<b>Figura 2.</b> A. Árbol de papayuela. B. Fruto de papayuela	19
<b>Figura 3.</b> A. Área de cosecha y producción de papayuela en Colombia	23
<b>Figura 4.</b> Signos de marchitez vascular en plantas de papayuela	27
<b>Figura 5.</b> Infección por <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de tomate	28
<b>Figura 6.</b> Esporas de <i>Fusarium</i> . A. Microconidios. B. Macroconidios. C. Clamidosporas	29
<b>Figura 7.</b> Ubicación espacial de los municipios en estudio en el departamento de Boyacá	34
<b>Figura 8.</b> Cultivo de Papayuela en Ramiriquí (Boyacá) con signos MV	35
<b>Figura 9.</b> Corte transversal de tallo de papayuela ( <i>Vasconcellea pubescens</i> A.DC.)	37
<b>Figura 10.</b> Hongo esporulando en cámara húmeda en muestra de tallo afectado	38
<b>Figura 11.</b> Muestra de tallo de Ramiriquí, cámara húmeda hongo PRaCH	46
<b>Figura 12.</b> Muestra de tallo de Maripí, cámara húmeda hongo PMaCH	45
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de bacterias en agar lignina	52
<b>Figura 14.</b> Crecimiento de hongos en agar lignina	55
<b>Figura 15.</b> Crecimiento bacteriano de los aislamientos en agar celulosa	56
<b>Figura 16.</b> Crecimiento de los aislamientos fúngicos	57
<b>Figura 17.</b> Características bioquímicas bacterianas evaluadas	59
<b>Figura 18.</b> Características macroscópicas y microscópicas de la colonia PMaMT2	60
<b>Figura 19.</b> Características macroscópicas y microscópicas de la colonia PMaDT2	61
<b>Figura 20.</b> Características macroscópicas y microscópicas de la colonia PCED	62

<b><i>Figura 21.</i></b>	Micelio del aislamiento de Ramiriquí PRaCH en agar PDA	64
<b><i>Figura 22.</i></b>	Células conidiógenas del aislamiento de Ramiriquí PRaCH	65
<b><i>Figura 23.</i></b>	Micelio del aislamiento de Sotaquirá PSoCH en agar PDA	66
<b><i>Figura 24.</i></b>	Células conidiógenas del aislamiento de Sotaquirá PSoCH	66
<b><i>Figura 25.</i></b>	Micelio del aislamiento de Maripí PMaCH en agar PDA	67
<b><i>Figura 26.</i></b>	Células conidiógenas del aislamiento de Maripí PMaCH	68
<b><i>Figura 27.</i></b>	Micelio del aislamiento de Cómbita PCTD en agar PDA	68
<b><i>Figura 28.</i></b>	Células conidiógenas del aislamiento de Cómbita PCTD	69

## Lista de Gráficas

<b>Gráfica 1.</b>	Crecimiento de bacterias en agar lignina	49
<b>Gráfica 2.</b>	Crecimiento de hongos en agar lignina	53

## Introducción

La papayuela (*Vasconcellea pubescens*. A. DC.), es un árbol presente en el continente americano que pertenece a la familia de las *Caricaceae* y al género *Vasconcellea*. Su cultivo está ampliamente distribuido en América Latina, siendo una especie con potencial para la industrialización por su suave sabor y aroma, además ha demostrado tener propiedades farmacéuticas, fitoquímicas y potencialidad para ser usada como fuente genética para fitomejoramiento de la papaya (*Carica papaya*) al proveer genes de resistencia al virus de la mancha anular, entre otras propiedades (Scheldeman *et al.* 2007; David *et al.*, 2011; Robles, 2014; Carrasco *et al.*, 2014).

En Colombia la producción de papayuela ha venido creciendo de forma consistente en los últimos años, tal que para el año 2010 se registró una producción de cerca de 112 toneladas y para el 2020 esta producción se incrementó a 626 toneladas, de igual forma, reportaron que aumentó el área destinada a este cultivo en donde se destacan los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, entre otros (AGRONET, 2022). Además, en los departamentos como Boyacá, Cauca y Nariño la papayuela hace parte de las especies autóctonas que aportan a la seguridad alimentaria de las comunidades rurales y de importancia económica para los mercados locales. Por otro lado, el departamento de Boyacá, es el principal productor de papayuela entre los cuales se destacan los municipios de Sotaquirá, Ramiriquí, Maripi, Cómbita y Nuevo Colón, entre otros (Tovar 2019; Acevedo y Jiménez, 2019).

En Boyacá desde hace pocos años los agricultores han reportado afectaciones del cultivo de papayuela, refiriendo la presencia de daños en estructuras vegetativas a manera de pudrición vascular, inicialmente se presenta marchitez de las hojas, pudrición en los haces vasculares, caída de las hojas y finalmente se desencadena la muerte de la planta. De acuerdo a lo documentado por Fonseca, (2020), el agente causal aún es desconocido y es el motivo de grandes pérdidas económicas para los agricultores rurales de varios municipios.

Por la importancia económica, ecosistémica y sociocultural del cultivo de papayuela en la región, se desarrolló esta investigación que busca caracterizar de forma preliminar los microorganismos asociados a la enfermedad. En el laboratorio de Agronomía de la UNAD sede Tunja, se realizó las pruebas bioquímicas y claves taxonómicas para la identificación de los aislamientos realizados, posteriormente en medios de cultivo con lignina y celulosa, se determinó su actividad enzimática para degradar estos principales componentes de la pared celular en las plantas. La producción de estas enzimas se relaciona con la patogenicidad de los microorganismos evaluados. Los resultados permitieron hacer un acercamiento al diagnóstico de la enfermedad.

Este trabajo como opción de grado hace parte de un proyecto de investigación institucional de la convocatoria interna 010 de la UNAD que abordó la caracterización de síntomas y signos de la enfermedad de la pudrición vascular de la papayuela, además del aislamiento y caracterización preliminar de los microorganismos relacionados. Por lo tanto las condiciones de manejo agronómico y ambiental, se abordan en el macroproyecto en desarrollo.

## **Justificación**

En estos últimos años en diferentes cultivos de papayuela en el departamento de Boyacá, se ha presentado una nueva enfermedad que causa pudriciones vasculares y finalmente desencadena la muerte de las plantas. Su agente fitopatógeno es desconocido, causando pérdidas económicas a los agricultores en la región (Fonseca, 2020) y la amenaza de la sostenibilidad del cultivo.

Teniendo en cuenta el valor de este cultivo en la región y en Colombia, es de suma importancia realizar investigaciones a nivel de laboratorio que aporten al diagnóstico microbiológico del agente causal para que técnicos de campo y agricultores puedan establecer estrategias de control.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Caracterizar exploratoriamente los microorganismos asociados a la pudrición vascular de la papayuela (*Vasconcellea pubescens* A.DC.) en cuatro municipios de Boyacá.

### **Objetivos Específicos**

Aislar posibles microorganismos patógenos a partir de estructuras vegetativas de papayuela afectadas por la enfermedad.

Clasificar los aislamientos según su actividad enzimática en medios de cultivo con lignina y celulosa.

Identificar morfológica y bioquímicamente los microorganismos seleccionados.

## Marco Conceptual

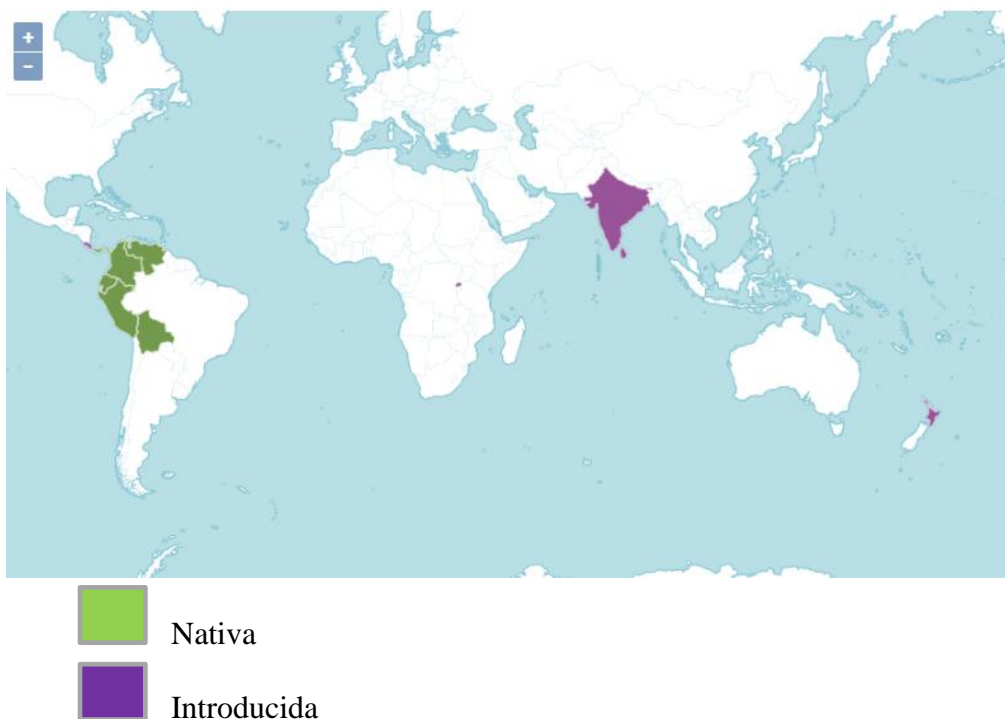
### 1.1 Generalidades de la Papayuela (*Vasconcellea pubescens* A.DC.)

La papayuela (*Vasconcellea pubescens*. A. D. C.), es un árbol presente en el continente americano que pertenece a la familia de las *Caricaceae* y al género *Vasconcellea*. Según The Plant List (2023) las principales especies descritas son: *Vasconcellea cauliflora* (Jacq.) A.DC., *Vasconcellea glandulosa* A. DC., *Vasconcellea goudotiana* Triana & Planch, *Vasconcellea microcarpa* (Jacq.) A.DC., *Vasconcellea parviflora* A. DC., *Vasconcellea pubescens* A.DC., *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. y *Vasconcellea weberbaueri* (Harms) V.M. Badillo, además, tiene cuatro sinónimos: *Carica candamarcensis* Hook.f., *Carica cestriflora* (A.DC.) Solms, *Carica pubescens* Lenné & K.Koch y *Vasconcellea cundinamarcensis* V.M.Badillo. También, posee varios nombres comunes como: papayo, tapayo de altura o papaya de tierra fría, chilacuán, chamburo, papaya silvestre, papayote, papayito de los Andes, higuillo chihualcán, siglalón, chichuacacón, titiis, babaco, entre otras (Benitez, *et al.* 2013 y Plants of the World Online, 2023).

Como se muestra en la Figura 1, este cultivo es de amplia distribución, nativa en países de América Latina como Bolivia, Colombia, Ecuador, Panamá, Perú y Venezuela. Sin embargo y según lo reportado por David, *et al.* (2011), Ecuador y Colombia son los centros de origen de la mayoría de las especies de este género. El cultivo fue introducido en países como Costa Rica, India, New Zealand North, Rwanda, Sri Lanka, islas Juan Fernández (Plants of the World Online, 2023).

**Figura 1.**

*Distribución mundial de papayuela nativa e introducida.*



*Fuente.* Plants of the World Online, 2023.

Según Plants of the World Online (2023) la papayuela (*Vasconcellea pubescens* A.D. C.) crece principalmente en biomas tropicales húmedos y conforme a lo referenciado por Fuertes, (2019) tiene preferencia por el clima frío. En Colombia la mayor riqueza se encuentra en elevaciones cercanas a los 2000 msnms y geográficamente se localiza en los departamentos de Caldas, Risaralda, Quindío, Cundinamarca, Nariño, Putumayo, Cauca, Huila y en Boyacá, se ubica en los municipios de Sotaquirá, Ramiriquì, Turmequé, Ventaquemada y Tibasosa, entre otros (Tovar 2019).

## 1.2 Morfología de la Planta

Illescas, (2022), describe que la papayuela (*Vasconcellea pubescens*. A. DC) es un árbol con altura entre 1.5 a 7 metros (m), tiene hojas con 5 a 7 lóbulos y presenta tres tipos de flores a saber: i. flores femeninas o pistiladas, sus colores varían entre amarillas, verdosas o blancas, con sombras de color rojo o púrpura, ii. flores masculinas o estaminadas de color amarilla, verdosas o blancas y iii. Las flores hermafroditas de colores blancas, amarillas y verdosas con sombras rojo-púrpuras y verdes. El fruto es alargado a ovoide con tamaño entre 6 a 15 cm de largo y de 3 a 8 cm de ancho y la cutícula puede ser amarillo o naranja. La pulpa es de color blanca o amarillo.

Por otro lado Robles, (2014), cita que al contrario de la papaya (*Carica papaya*), la papayuela (*Vasconcellea pubescens* A.D. C.), tiene frutos más pequeños con una cutícula más delgada y su textura, sabor y aroma son distintos, en la figura 2 se presenta la planta y el fruto de papayuela (Bernal, Gradstein y Celis, 2019).

### **Figura 2.**

**A.** Árbol de papayuela. **B.** Fruto de papayuela.



*Nota.* Plants of the World Online, 2023. Archivo personal, 2023.

### 1.3 Importancia Económica Ecosistémica y Cultural del Cultivo

La papayuela (*Vasconcellea pubescens* A. D. C.) tiene usos potenciales en distintos sectores de la economía. Tal es el caso de su potencial como material genético para fitomejoramiento de cultivos, Tovar, (2019) y Scheldeman *et al.* (2007) refiere que se puede emplear *Vasconcellea quercifolia* para tal propósito pues tiene un gen que la hace resistente al virus de la mancha anular del papayo (PRSV-P), lo cual redundará en la sanidad del cultivo. También, explican que, *Vasconcellea cundinamarcensis* puede ser un prometedor antifúngico natural para controlar agentes causales de enfermedades en cultivos agrícolas, disminuyendo el uso de fungicidas de síntesis química que tienen un grave efecto residual teratógeno, carcinógeno y ambiental.

Por otro lado, investigaciones realizadas por Torres *et al.* (2019), evidencian que el látex extraído de las superficies de los frutos inmaduros de papayuela tiene proteinasas de cisteína que modifican la pared y la integridad de la membrana celular vegetal en los tejidos de la planta huésped para inhibir la adherencia, germinación conidial y la elongación del tubo germinal de *Botrytis cinerea*, hongo fitopatógeno responsable de la enfermedad del moho gris, que causa daños a más de 200 especies de plantas agrícolas en todo el mundo.

Otro punto es su utilidad en aplicaciones biotecnológicas industriales y farmacológicas, por ejemplo, Carrasco *et al.* (2014), indican que la papayuela es una buena fuente de papaína, enzima proteolítica usada en la clarificación de la cerveza. Así mismo, Ferreira *et al.* (2019), reportan que esta planta tiene gran variedad de fitoquímicos que pueden aprovecharse en medicamentos. Tal como menciona, Gutiérrez *et al.* (2017), *Vasconcellea cundimarcensis* posee catalizadores de cisteína con propiedades anticoagulantes y antitrombóticas que disminuyen la activación plaquetaria en la sangre, también, estos investigadores detallaron que el látex de

*Vasconcellea quercifolia* actúan como un agente anticancerígeno porque está asociado clínicamente a la reducción y viabilidad de células malignas de cérvix y mama.

De igual modo, en medicina, por ejemplo, Lemos *et al.* (2016) describieron que la proteinasa de cisteína de *Vasconcellea cundimarcensis* tiene acción antihelmíntica contra la infección por nemátodos, además de actividad antiinflamatoria, buen efecto cicatrizante de heridas gástricas y quemaduras, ahora bien, los investigadores refieren que la fracción P1G10 de esta proteinasa se absorbe en el tejido gastrointestinal permaneciendo estable para ofrecer una acción gastroprotectora y cicatrizante gástrica. En otro estudio Oliveira y su grupo en 2020 reportaron que estas enzimas promueven la reepitelización en córneas de conejo con quemaduras químicas tras su administración tópica.

Por otra parte, en la industria alimentaria, también tiene uso potencial, para ilustrar, Folharini y colaboradores (2019) señalan que *Vasconcellea quercifolia* es considerada una planta alimenticia no convencional y funcional por su alto contenido de proteínas que favorecen la absorción de calcio y por lo tanto la prevención de la osteoporosis, también es rica en fibras para mejorar la funcionalidad intestinal y disminuir la absorción de carbohidratos y grasas, lo cual reduce la obesidad y el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Del mismo modo Da Silva *et al.* (2022), evaluaron el potencial alimentario de la harina obtenida de frutos verdes de *Vasconcellea quercifolia* y encontraron que por su buen contenido de aminoácidos, carbohidratos y fibra podría ser un excelente sustrato para productos biotecnológicos probióticos como fuente de carbono para el mantenimiento celular.

En el mismo sentido, Benitez, *et al.* (2013) refieren que en países como Chile, la especie *Vasconcellea cundinamarcensis*, es un cultivo de exportación comercial de alimentos, cuya producción se aprovecha en la industria de conservas, jugos y mermeladas, igualmente, Tovar,

(2019) indica que, en Colombia, *Vasconcellea pubescens*, tiene buenas características organolépticas como suave sabor y aroma, además su fruta fresca es comestible y se pueden elaborar jugos procesados, mermeladas, conserva, salsas, compotas, encurtidos y aromáticas (Scheldeman *et al.* 2007) por citar, *Vasconcellea cundinamarzensis*, *Vasconcellea goudotiana* y *Vasconcellea pubescens* son las especies que más se reportan para consumo humano y animal en el sur del país, por ejemplo, en Putumayo, Nariño y Cauca, se industrializan como mermeladas todo el año y en época de navidad se incrementa su demanda (Fuentes 2019).

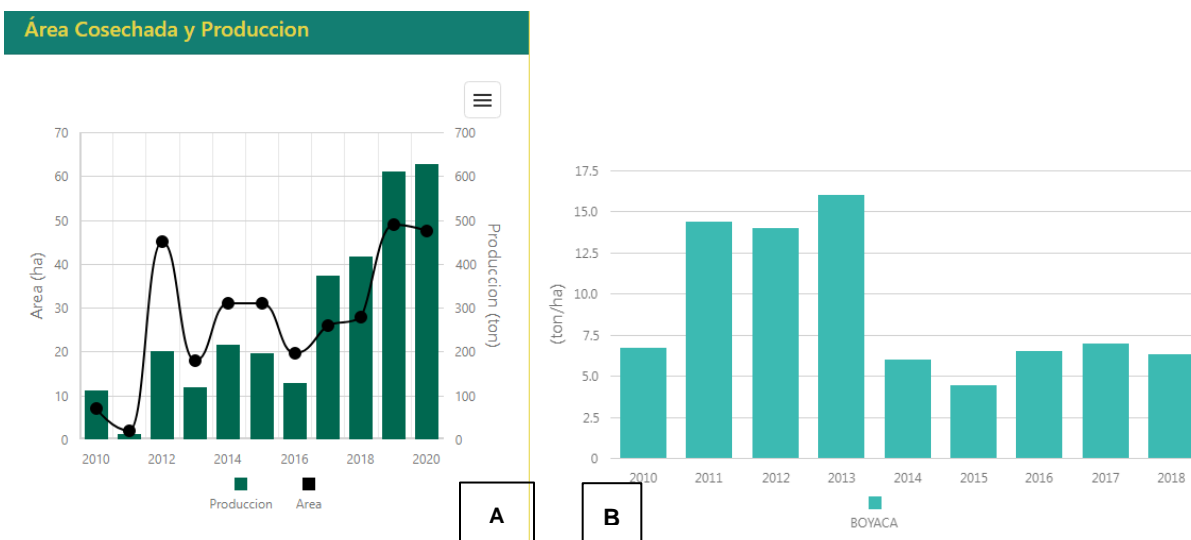
Por lo que se refiere a Boyacá, Acevedo y Jiménez (2019), explican que, en el departamento, el cultivo de papayuela (*Vasconcellea pubescens*. A. DC), hace parte de las especies consideradas de seguridad alimentaria de los campesinos y está distribuido en su agricultura familiar y comunitaria, además, es de importancia económica en las regiones al tener presencia en los mercados locales y generar empleo.

#### **1.4 Producción y Rendimiento en Colombia**

De acuerdo con La red de información y comunicación del Sector Agropecuario (AGRONET), como se indica en la Figura 3A, en Colombia, para el año 2010 se registró una producción de frutos de papayuela de 112 toneladas y para el 2020 esta producción se incrementó a 626 toneladas, de igual forma, reportaron que aumentó el área destinada a este cultivo en donde se destacan los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, entre otros (AGRONET, 2022). Por otro lado, en el caso del comparativo de rendimiento departamental para esta plantación, en la figura 3B se observa que, en Boyacá, para el año 2010 el rendimiento fue de 6.6 Ton y para el año 2018 fue de 6.3 Ton.

**Figura 3.**

*Producción y Rendimiento de papayuela en Colombia.*



*Nota.* **A.** Área de cosecha y producción de papayuela en Colombia. **B.** Rendimiento departamental por cultivo de papayuela en Colombia. Agronet, estadísticas, 2023.

### 1.5 Enfermedades del Cultivo

Las plantas se enferman sólo si concurren a la vez tres factores en el tiempo; hospedero susceptible, agente causal virulento y condiciones ambientales favorables, cuando la causa es por procesos biológicos, se altera la fisiología del huésped y la patología se vuelve dinámica variando en magnitud e intensidad, aparte, se pueden percibir síntomas y signos que dependen también de los tres factores mencionados, las señales iniciales, pueden ser apenas perceptibles o presentarse marchitez por deshidratación, cambios de color en hojas y tallos como: clorosis, amarillez, moteados, anillos, ennegrecimiento o coloración café oscura de los tejidos, malformaciones de los órganos de la planta y muerte celular, por otra parte, los signos de la enfermedad pueden mostrar al patógeno sobre los tejidos parasitados, por ejemplo, las bacterias se presentan como un exudado blanco-cremoso y los hongos se manifiestan con un crecimiento

de colonias fungosas sobre los tejidos parasitados, además, fructificaciones macroscópicas y esclerocios (Latorre, 2018).

Robles, *et al.* (2016) refiere que las bacterias fitopatógenas causan bacteriosis y pueden provocar una reducción significativa en la producción de cualquier cultivo afectado, problemas reproductivos y la muerte de la planta con un gran impacto económico. Por otro lado, Latorre, (2018) indica que las micosis causadas por hongos fitopatógenos presentan gran especificidad por sus hospederos. Son parásitos obligados y ocasionan las royas, los mildius, oídios y algunos carbones. Causan alrededor del 75% del total de enfermedades, siendo las de mayor impacto económico en las plantas cultivadas.

De acuerdo a lo citado por Maselli, (2010) y Latorre, (2018), el cultivo de papayuela (*Vasconcellea pubescens* A.DC.) es afectado por agentes fitopatógenos como bacterias y hongos que causan enfermedades en las diferentes etapas del cultivo, estos microorganismos establecen relaciones parasitarias complejas con su huésped cuando infectan los tallos, ramas, frutos y flores, además se transmiten entre plantas enfermas y sanas. A este respecto, Robles, *et al.* (2016) citan que en este cultivo, las bacteriosis más comunes son el tumor del cuello; causada por *Agrobacterium* sp. y la pudrición radical; ocasionada por *Erwinia* sp., por otro lado, las principales infecciones fúngicas son Cenicilla; originada por *Oidium* sp. y Lancha Temprana; provocada por *Alternaria* sp. y Marchitez Vascular (MV) por *Fusarium oxysporum*, además, Faria, Ferreira & Weingart (2020) detectaron manchas necróticas en las hojas de *Vasconcellea monoica* causadas por el hongo *Stagonosporopsis caricae*.

Por otra parte Robles, *et al.* (2017), refiere en sus investigaciones que en Ecuador desde 1996 se observaron los primeros brotes de Marchitez Vascular ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum*, y que esta enfermedad se dispersó en todo el territorio nacional por el

intercambio del material vegetativo entre las diversas zonas productoras. Actualmente, en el sur de ese país, las estrategias de control para la enfermedad no son del todo eficientes, probablemente porque las condiciones ambientales son diferentes en cada región y a que este hongo no es el único causante de la enfermedad.

Con respecto a Colombia, en el departamento de Boyacá, se ha registrado una nueva enfermedad que causa pudrición vascular a los cultivos de papayuela (*Vasconcellea pubescens*. A. DC). Las plantas perjudicadas inicialmente presentan marchitez, luego pudrición en los haces vasculares, caída de las hojas que finalmente desencadena en la muerte, de acuerdo a lo documentado por Fonseca, (2020) el agente causal aún es desconocido y es el motivo de grandes pérdidas a los agricultores en la región.

En el año 2021, productores de la vereda Sabaneta municipio de Maripí (Boyacá), debido a la gravedad y prevalencia de la enfermedad asociada a una pudrición vascular en plantas de papayuela, enviaron muestras al laboratorio de sanidad vegetal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) regional Chiquinquirá, en donde se identificó a *Fusarium oxysporum* en las muestras analizadas, en consecuencia, el pasado 16 de agosto de 2022, la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Ambiental de Maripí emitió comunicación oficial con este hallazgo a la Asociación Hortofrutícola de Colombia (Asohofrucol) (Anexo 1).

### ***Marchitez vascular***

La papayuela (*Vasconcellea pubescens*. A. DC) según lo referido por Robles *et al.*, (2014) y Espinosa, (2016), es una planta propagada de manera vegetativa y asexual, los agricultores utilizan parte de las planta como estacas, brotes tiernos o injertos que nacen al pie de la planta madre. Sin embargo, este sistema facilita el establecimiento de enfermedades como la

Marchitez Vascular que causa reducciones entre el 50 a 100% en la producción de plántulas y 100% en la producción de la fruta.

De esta manera, Bravo, Larriva y Minchala, (2012) referencian que la Marchitez Vascular originada por el hongo ubicuo *Fusarium oxysporum*, desarrolla micelios y estructuras de resistencia como esporas con las que puede sobrevivir por años en el suelo. Luego, estos conidios se pueden trasladar en el agua, el viento, en equipos agrícolas, en injertos y trasplantes, facilitando su diseminación entre los cultivos e invadiendo los nuevos. Además, al tener un estado saprofítico en el suelo y un estado parasítico especializado en plantas, le permite asociarse con otros microorganismos y formar sinergismos, haciendo una de las especies más relevantes del género y en la economía de los cultivos (Robles *et al.*, 2016)

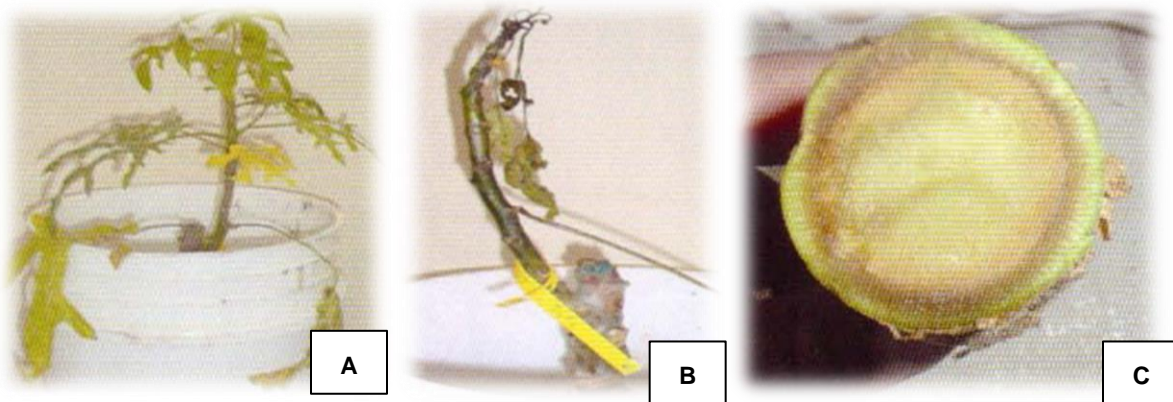
Según lo descrito por Robles *et al.* (2016), la Marchitez Vascular es una enfermedad con una serie de alteraciones vasculares causadas por el fitopatógeno cuando invade el xilema y el floema de la planta. Por un lado Agrios, (2012), reporta que el micelio del hongo para crecer requiere consumir los elementos disponibles de la planta, para esto libera enzimas las cuales pueden ser ligninolíticas, celulolíticas y fosfolipasas que pueden contribuir indirectamente en el avance de la enfermedad, por ejemplo, las moléculas de celulosa liberadas en la corriente de la transpiración dificultan el normal movimiento del agua en la planta. Por otra parte, Di Petro *et al.*, (2001) cita que el microorganismo libera fitotoxinas que causan necrosis de las células que integran los tejidos conductores y obstruyen los vasos cribosos de xilema impidiendo la circulación normal de los nutrientes.

Como se observa en la figura 4, cuando se afecta el sistema vascular las células pierden turgencia, aparece epinastia, atrofia y clorosis en las hojas bajas para extenderse a toda la planta, ocasionando finalmente la defoliación total, pudrición descendente del tallo y destrucción

de las raíces. Igualmente, Dean *et al.*, (2012) y Bravo, Larriva y Minchala, (2012) mencionan que el tejido del ápice vegetativo se torna café y el tallo se vuelve de consistencia acuosa (Figura 6). Además, indican que los frutos pueden permanecer deshidratados y marchitos en la planta, pero casi todos caen.

**Figura 4.**

*Signos de marchitez vascular en plantas de papayuela.*



**Nota.** **A.** Clorosis de hojas bajas. **B.** Pudrición descendente del tallo. **C.** Células vegetales

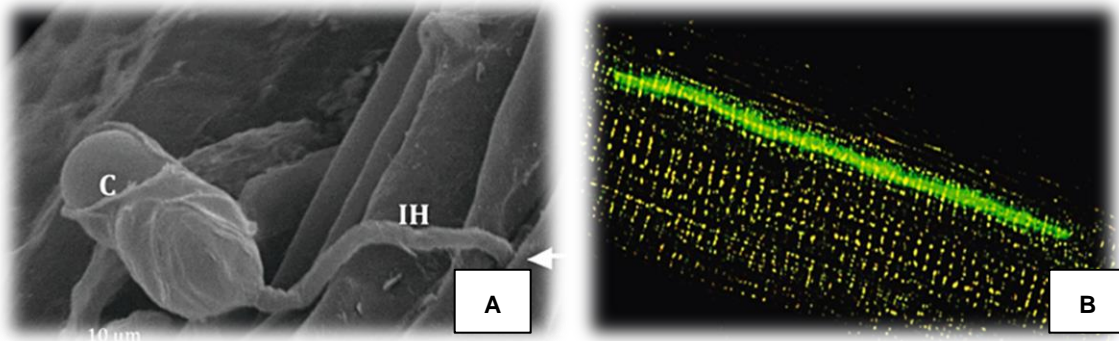
dañadas en tallo. Fuente. Bravo, Larriva y Minchala, 2012.

Dean *et al.*, 2012, Di Petro *et al.*, 2001, Bravo, Larriva y Minchala 2012, describen que en la infección de *Fusarium*, los tubos germinales o esporas se unen a las superficies externas o aberturas naturales de los órganos de la planta como pelos absorbentes o heridas causadas por labores agrícolas, daños de insectos o nemátodos (figura 5). Luego por crecimiento dirigido, los micelios infecciosos penetran la raíz de la planta, después colonizan las células epidérmicas de la corteza y los vasos xilemáticos. Posteriormente el hongo ramifica sus hifas, se disemina y origina microconidios que se desprenden y ascienden al tallo. Finalmente, los microconidios viajan a

través del flujo de la savia a la parte superior y ápice de la planta para provocar su muerte y esporular en macroconidias que se diseminan para iniciar una nueva infección. La figura 6 muestra que *Fusarium* forma tres tipos de esporas asexuales reproductoras para multiplicarse, diseminarse (microconidios y macroconidios) y para resistir condiciones adversas (clamidosporas) (Bravo, Larriva y Minchala 2012).

**Figura 5.**

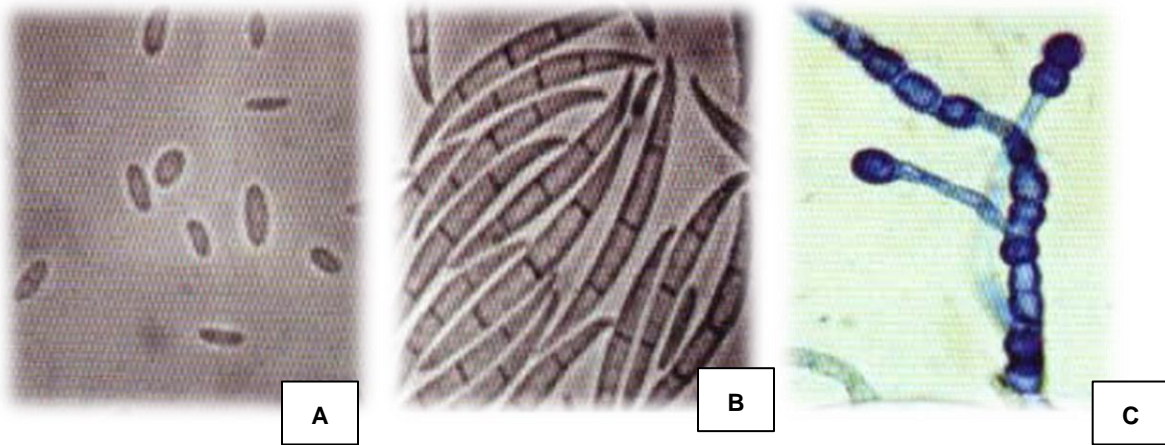
*Infección por Fusarium oxysporum en plantas de tomate*



Nota. **C.** microconidios germinando y micelio adherido a la superficie de la raíz. **IH.** penetración dirigida hacia una abertura natural de las células epidérmicas de la corteza de la raíz (flecha) **B.** Hifa de *Fusarium oxysporum* creciendo en un vaso de xilema de una raíz de tomate. Dean *et al.*, 2012.

**Figura 6.**

Esporas de *Fusarium*



*Nota.* **A.** Microconidios. **B.** Macroconidios. **C.** Clamidosporas. Fuente. Bravo, Larriva y Minchala, 2012

Por otra parte, en la Marchitez vascular bacteriana, el propágulo puede llegar a través del agua, herramientas, insectos y en menor medida por el viento, depositándose en las superficies externas de los órganos de la planta. Además, gracias a su capa polisacáridos, estos microorganismos, pueden sobrevivir e hibernar en: plantas infectadas, semillas, tubérculos, residuos vegetales, suelo y en insectos vectores. Adicionalmente, estos microbios, poseen una cubierta mucilaginosa de glucoproteínas que les facilita su adherencia a la planta huésped (Agrios, 2012).

Las bacterias, ingresan a la planta a través de heridas viejas o recientes, estas pueden ser tejidos lacerados o destruidos por daños mecánicos, depredación de animales, prácticas agrícolas o heridas por otros patógenos. Ocasionalmente pueden penetrar por aberturas naturales como estomas a través de gotas de agua que facilitan su introducción a la cavidad subestomática o también, pueden introducirse a los hidátodos; orificios del borde y ápices de las hojas, que secretan gotitas de nutrientes atractivos a los microorganismos (Agrios, 2012).

Para causar la enfermedad, las bacterias inicialmente secretan toxinas que destruyen las células hospedantes afectando la permeabilidad de la membrana celular, también segregan enzimas como celulasas que maceran las células vegetales y su pared, posteriormente, penetran internamente a todos los vasos xilemáticos de las raíces, el tallo o la parte superior de las plantas, seguidamente colonizan y se multiplican con gran velocidad entre las células del hospedante o en su interior, luego invaden e infectan los tejidos nuevos a través del xilema y finalmente para llegar a la superficie de la planta, lo hacen a través de heridas y grietas (Agrios, 2012).

### **1.6 Detección de Fitopatógenos**

El avance de una enfermedad en un cultivo y en una zona geográfica definida, conduce al desarrollo de una epidemia que puede progresar de forma rápida. Para reducir los efectos y daños económicos producidos por las enfermedades es necesario detectar una epidemia en sus primeros estadios dentro del progreso de una enfermedad, antes que este alcance niveles críticos (Latorre 2018).

El diagnóstico correcto es un requisito indispensable para el control de las enfermedades. Para determinar el agente causal no solo basta con la observación de los síntomas porque pueden coincidir con un daño abiótico u otros agentes bióticos, también es necesario el análisis en el laboratorio, lo cual requiere la aplicación de protocolos integrados desde pruebas iniciales rápidas y confirmaciones con técnicas más especializadas. La identificación pretende situar taxonómicamente y dar nombre al organismo diagnosticado y se basa en las características comunes que los miembros de una especie, raza o patovar poseen y que los diferencian de otros (López, Murillo y Palacio 2018).

Existen numerosas técnicas y protocolos para el diagnóstico e identificación de fitopatógenos que varían de acuerdo al tiempo requerido, su especificidad y sensibilidad. Los protocolos convencionales incluyen el aislamiento en medios de cultivo, observación al microscopio, pruebas serológicas, pruebas de patogenicidad y su identificación mediante pruebas morfológicas y tinciones (López, Murillo y Palacio 2018).

Por otra parte, en la tipificación preliminar de hongos se usan características culturales y morfológicas del cultivo usando claves dicótomas o taxonómicas. Las bacterias fitopatógenas; generalmente bacilos Gram negativos, se caracterizan bioquímica y fisiológicamente evaluando su actividad enzimática, la producción de pigmentos y el crecimiento en medios selectivos y diferenciales ya estandarizados. Otros métodos bioquímicos para el diagnóstico de procariotas son los sistemas multitest comerciales que disponen de bases de datos como MicroScan o API. Existen otras técnicas más especializadas para la identificación, estas son pruebas moleculares como PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que amplifica el ADN o RT-PCR que amplifica el ARN (Robles, 2017; López, Murillo y Palacio 2018).

## Metodología

### 2.1 Zonas de Estudio

Se realizaron recorridos de campo por cuatro municipios del departamento de Boyacá, donde se visitaron diferentes cultivos de papayuela (*Vasconcellea pubescens* A.DC.) los cuales presentaban alto niveles de afectación sanitaria. Los municipios visitados fueron: Ramiriquí, Sotaquirá, Maripí y Cómbita, en la figura 7 se muestra la ubicación espacial de los municipios en estudio en el departamento de Boyacá. A continuación se presenta el clima de los territorios, según lo reportado por Weather Spark y Cedar Lake Ventures, Inc. ([support@weatherspark.com](mailto:support@weatherspark.com)) y de acuerdo al plan de ordenamiento territorial para el departamento de Boyacá (Gobernación De Boyacá, 2023), se indican las características más relevantes de cada uno:

#### 2.1.2 *Ramiriquí:*

Es un municipio ubicado al centro del departamento, es de clima irregular con una temperatura entre los 14°C y 25°C que disminuye rápidamente con la altitud, los suelos para cultivo son profundos y moderadamente profundos, de textura media, moderadamente fina y fina, tienen buen drenaje y una reacción fuertemente ácida, su fertilidad es baja; presentan gran susceptibilidad a la erosión, está ubicado a 2325 m s.n.m., en Ramiriquí llueve todo el año, el mes con más lluvia es mayo, con un promedio de 185 milímetros de lluvia y el mes con menos lluvia es enero, con un promedio de 33 milímetros. Su actividad económica es la producción de frutas, elaboración de arepas y turismo. El cultivo del muestreo se localizó en la vereda Resguardo Alto en un área cultivada de 6.400 m<sup>2</sup>.

#### 2.1.3 *Sotaquirá:*

Está localizado al centro-oriente del departamento, es de clima frío con una temperatura entre los 6°C y los 18°C, los suelos para cultivo son moderadamente profundos, tienen una reacción

fuertemente ácida y su fertilidad es moderadamente alta; está ubicado a 2860 msnm, en Sotaquirá llueve todo el año, el mes con más lluvia es octubre, con un promedio de 181 milímetros de lluvia y el mes con menos lluvia es enero, con un promedio de 34 milímetros. Su actividad económica es la producción de leche y frutas. El cultivo del muestreo se localizó en la vereda Gaunza en un área cultivada de 3.200m<sup>2</sup>.

#### **2.1.4 Maripí:**

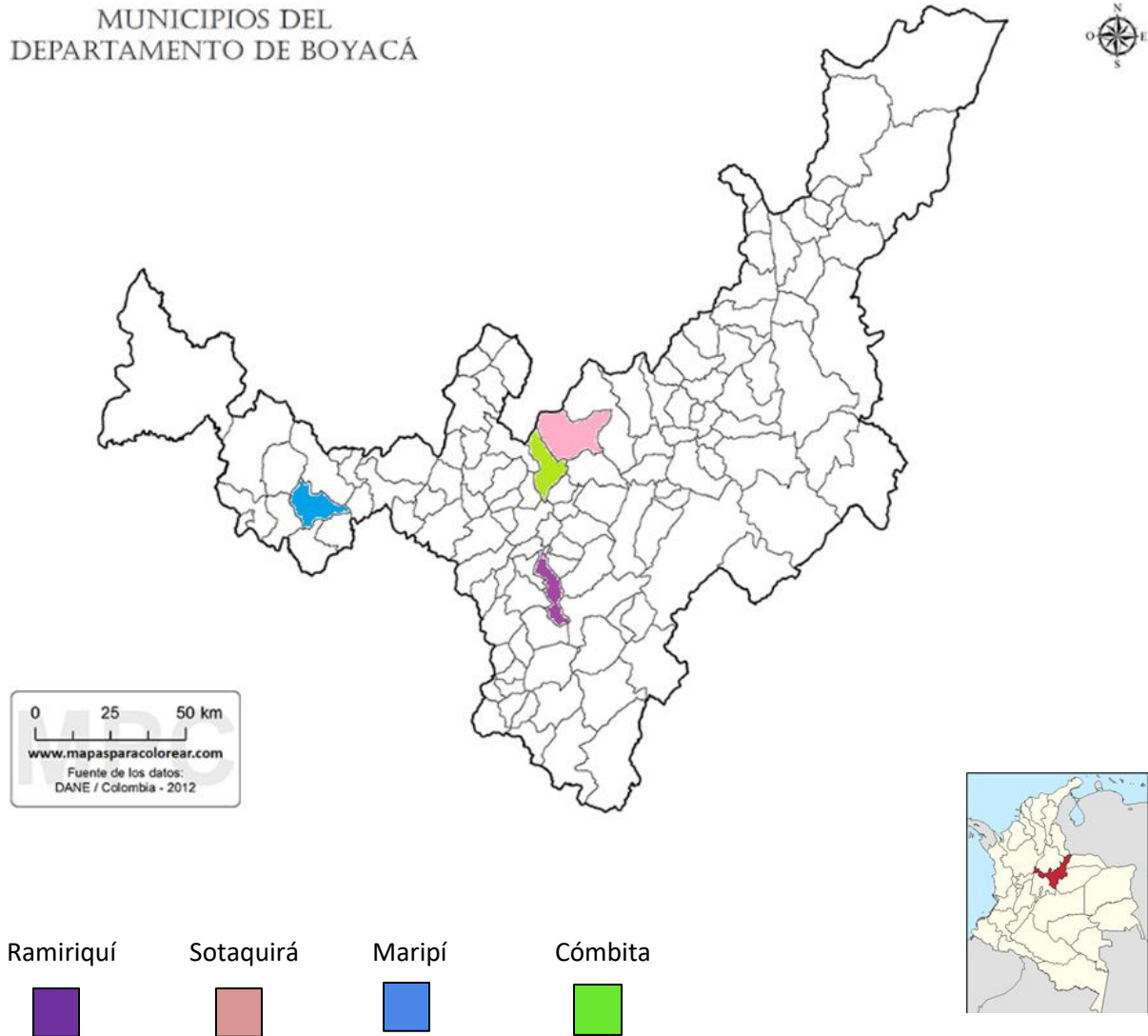
Está situado al occidente, su clima es tropical de montaña y posee tres pisos térmicos con temperaturas que oscilan entre los 10°C y 24°C, los suelos para cultivo son drenados, localizados en coluvios; profundos a superficiales, de texturas francas y fertilidad baja, está ubicado entre 425 a 2950 a 1249 m s.n.m., en Maripí llueve durante el año, el mes con más lluvia es octubre, con un promedio de 213 milímetros de lluvia y el mes con menos lluvia es enero, con un promedio de 52 milímetros de lluvia. Su actividad económica es la agricultura y la minería como las esmeraldas. El cultivo del muestreo se localizó en la vereda Sabaneta.

#### **2.1.5 Cóbbita:**

Está radicado al centro-norte, su clima es irregular con temperaturas que oscilan entre los 5°C y 18°C, los suelos para cultivo tiene pendientes fuertes y son quebrados, moderadamente profundos y sin erosión a moderada, está ubicado 2850 m s.n.m., en Cóbbita llueve durante el año, el mes con más lluvia es octubre con un promedio de 182 milímetros de lluvia y el mes con menos lluvia es enero, con un promedio de 34 milímetros de lluvia. Su actividad económica es la explotación bovina. El cultivo del muestreo se localizó en la vereda Concepción bajo en un área cultivada de 1 hectárea.

**Figura 7.**

*Ubicación espacial de los municipios en estudio en el departamento de Boyacá.*



*Nota.* Adaptado de Mapas para colorear, 2023

## 2.2 Muestreros

Se visitaron cultivos con fuerte afectación evidente de clorosis. Se tomaron muestras a partir plantas con las características de la enfermedad, como daño en hojas inferiores, y

defoliación, además se obtuvieron cortes transversales y longitudinales del tercio inferior de tallos en donde se identificó material de color oscuro (figura 8), las muestras fueron empacadas en papel Kraft húmedo y transportadas en nevera de icopor. También se tomaron muestras de exudados del tallo las cuales fueron depositadas en frascos estériles.

**Figura 8.**

*Cultivo de Papayuela en Ramiriquí (Boyacá) con signos de Marchitez Vascular.*



*Nota.* Vereda Resguardo Alto. **A.** Clorosis en hojas inferiores. **B.** Defoliación severa. **C.** Signos de pudrición vascular (células vegetales dañadas en tallo). Fuente. Archivo fotográfico. Ing. Jorge Fonseca C.2022

### 2.3 Lugar de Procesamiento

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Agronomía del CEAD Tunja de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), localizado a 2650 m s.n.m. con una

temperatura promedio de 13 ° y ubicado en el departamento de Boyacá- Colombia. El laboratorio estaba equipado con cabina de flujo laminar, incubadora, nevera, autoclave, entre otros materiales y equipos adecuados para el procesamiento de las muestras.

## **2.4 Aislamiento de Posibles Microorganismos Patógenos a Partir de Estructuras Vegetativas de Papayuela Afectadas por la Enfermedad.**

### **2.4.1 Hongos**

Los tallos y ramas afectadas se lavaron superficialmente con agua corriente por 2 minutos para eliminar partículas del suelo y otras sustancias que pudieran estar en la superficie de la muestra. Posteriormente se realizaron cortes transversales de 0.5 cm de largo (figura 9). Para eliminar microorganismos saprófitos y no patógenos de la superficie vegetal, los cortes se desinfectaron por inmersión durante 1 minuto en hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.0% y 1 minuto en alcohol etílico al 70%, de igual forma, se lavaron por tres veces en agua destilada estéril por 1 minuto. Por último, se sembraron 4 secciones desinfectadas en medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA de SHARLAU + cloranfenicol). Las cajas de petri se sellaron con papel vinipel y se llevaron a incubar a 25°C durante 8 días conforme al procedimiento descrito por Patiño, (2020). Transcurrido este tiempo las colonias aisladas se purificaron en agar PDA incubando a 25°C durante 8 días para conservar en papel filtro en refrigeración.

**Figura 9.**

*Corte transversal de tallo de papayuela (Vasconcellea pubescens A.DC.).*



*Nota.* Archivo fotográfico personal, Ing. Mónica Patiño 2022

Por otro lado, se instalaron cámaras húmedas con los tallos y ramas afectadas para inducir esporulación y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 72 horas. Los hongos esporulados (figura 10) se sembraron en agar PDA + cloranfenicol y se incubaron a 25°C por 8 días según lo descrito por Patiño (2020). Transcurrido este tiempo las colonias aisladas se purificaron en agar PDA incubando a 25°C durante 8 días para conservar en papel filtro en refrigeración.

**Figura 10.**

*Hongo esporulando en cámara húmeda en muestra de tallo afectado*



*Nota.* Archivo fotográfico personal, 2022

#### **2.4.2 Bacterias**

Se procedió a lavar por 2 minutos las muestras de tallos y ramas afectadas con abundante agua de llave a fin de eliminar la mayor cantidad de contaminantes. Una vez lavado, se hicieron cortes transversales de 0.5 cm de largo del tejido afectado de tallo y ramas. Posteriormente se desinfectaron con Tween 20 al 1% por 45 segundos para luego enjuagar con agua estéril por tres veces, después el tejido fue picado y macerado finamente en un mortero estéril, luego fue mezclado con unas gotas de solución salina normal al 0.9% para sembrar la suspensión con hisopo estéril y asa bacteriológica por agotamiento en Agar nutritivo (SHARLAU) MacConkey (MERCK) según lo referido por Castaño y Del Río (1997), Corzo y Quiñonez (2017).

Las muestras de exudados de tallos afectados se sembraron directamente por agotamiento con hisopo estéril y asa bacteriológica en Agar Nutritivo y MacConkey. Finalmente, se llevaron a incubar a 28°C por 48 horas, al cabo de este tiempo se aislaron aquellas colonias que se observaron bien definidas y solitarias en los agares.

Para identificar las bacterias se utilizó la técnica de coloración de Gram, con esta tinción, las células bacterianas Gram negativas se tiñeron de rosa o fucsia y las Gram positivas de azul o morado, además, y para confirmar su naturaleza Gram negativa, se evaluó la respuesta positiva a la solubilidad con KOH (hidróxido de potasio) al 3%; que de acuerdo al protocolo de Castaño y Del Río, (1997), el KOH es capaz de romper las paredes de las bacterias, liberando el ADN viscoso, de esta manera se forma un hilo de aspecto mucilaginoso en la colonia bacteriana al contacto con el reactivo y un asa redonda. Finalmente, y de acuerdo a lo publicado por Sánchez, (2005) las bacterias seleccionadas, se conservaron en caldo Brain Heart Infusion BHI (SHARLAU) con glicerol al 10% a -20°C.

## **2.5 Clasificación de los Aislamientos Según su Actividad Enzimática en Medios de Cultivo con Lignina y Celulosa**

Este objetivo buscó medir la actividad enzimática *in vitro* de los microorganismos previamente aislados, para seleccionar los aislamientos fúngicos y bacterianos por su mayor velocidad de crecimiento al degradar lignina y celulosa; principales componentes de tejidos vegetales del tallo. De acuerdo al protocolo aplicado por Martínez, (2017) y Patiño, (2020), se empleó agar carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato para determinación de la capacidad de degradación de celulosa, así: Carboximetilcelulosa 10g/L, sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5 gr/L, cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 0.5 gr/L, fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.1 gr/L, Sulfato de magnesio 0.1 gr/L y agar 15g/L. El otro medio fue agar lignina (AL), en el cual se usó como única fuente de carbono salvado de trigo triturado y tamizado 4gr/L, el salvado se llevó a cocción bajo fuego durante 20 minutos y luego se coló, a este líquido recuperado se le adicionó agar 15g/L. Los anteriores medios preparados se llevaron a esterilizar en autoclave por 15 minutos a

120°C a 15 libras de presión, posteriormente se sirvieron en placas de petri. En el anexo 3 se referencia la composición de los medios de cultivo sólidos.

La evaluación de la actividad enzimática ligninolítica y celulolítica se realizó tanto para los hongos como para las bacterias. En el caso de los hongos se evaluaron 4 aislamientos y como control positivo el hongo (*Pleurotus ostreatus*) conocido por su potencial ligninolítico, para un total de 5 tratamientos con sus respectivas repeticiones. Para las bacterias igualmente se evaluaron 16 aislamientos y un control positivo (*Ralstonia* sp.) de tipo Gram negativa poseedora de un factor de patogenicidad vascular, para un total de 17 tratamientos. Es importante mencionar que *Ralstonia* sp. proviene del cepario del laboratorio de fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL) y el hongos *Pleurotus ostreatus* proviene del cepario del Laboratorio de Agronomía CEAD Tunja de la UNAD.

Para la evaluación se procedió de la siguiente forma: se colocó un disco de papel filtro esteril de 0.5mm de diámetro con micelio de cada hongo en cada uno de los agares con lignina (AL) y carboxicelulosa (CMC) por triplicado. Por otro lado, se inocularon 100uL de suspensión bacteriana, escala 0.5 de MacFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) en discos de papel filtro estéril de 0.5 cm de diámetro en medios AL y CMC por triplicado. Posteriormente se llevaron a incubar a 28°C durante 24, 48 y 72 horas para bacterias y 6 días para hongos. La actividad de enzimas ligninolíticas se evaluó midiendo el diámetro de crecimiento en milímetros (mm) de cada una de las colonias en los medios de cultivo con lignina (AL).

La actividad de enzimas celulolíticas se estimó con el diámetro de crecimiento en milímetros (mm) de cada colonia en los medios de cultivo CMC y el potencial celulítico del microorganismo se determinó midiendo en milímetros (mm) el halo de degradación de celulosa. Para apreciar los halos de degradación se agregó a cada caja de petri rojo congo al 1% durante 15

minutos como medio de contraste, posteriormente se retiró el exceso de tinte con solución salina al 1%. El agar CMC se pigmenta de rojo por afinidad entre el colorante y el polímero de celulosa aún no hidrolizado, cuando el microorganismo es capaz de hidrolizar la celulosa del medio, se observa un halo claro alrededor de la colonia.

## 2.6 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante un diseño experimental completamente al azar, se utilizó como unidad experimental, una caja Petri. Se evaluaron 5 aislamientos fúngicos y 17 aislamientos bacterianos, cada uno con tres repeticiones.

Se proponen las siguientes hipótesis para la evaluación de las pruebas ligninolíticas y celulolíticas tanto de los aislamientos bacterianos como de los hongos:

$$H_0: \mu_1 = \dots = \mu_k, \quad k = 1,2,3$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j, \quad \text{para algún par } (i, j)$$

La hipótesis nula ( $H_0$ ) establece que los promedios en crecimientos de los aislamientos son iguales, mientras que la hipótesis alterna ( $H_1$ ) propone que al menos uno de los aislamientos tiene crecimiento diferente. Para lo anterior, los datos de las mediciones fueron sometidos al test de normalidad de Shapiro-Wilk y análisis de varianza (ANOVA) para rechazar o aceptar la hipótesis nula. Cuando este test arroja la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos se aplica la prueba de Duncan para determinar los tratamientos que difieren significativamente, se usa como parámetro un 95% de confianza ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) con el paquete estadístico del Software Rstudio (Anexo 4).

## **2.7 Identificación Morfológica y Bioquímica de los Microorganismos Seleccionados**

### **2.7.1 Hongos**

Las características culturales y morfológicas de los aislamientos fúngicos se determinaron mediante la observación del color, aspecto del anverso y reverso de las colonias en el agar. También con la técnica de microcultivo de cada uno de los aislamientos se observaron microscópicamente con azul de lactofenol las estructuras fructificantes y el micelio a través del microscopio óptico (OLYMPUS) objetivo de 40x. La identificación a nivel de género se definió comparando las características macroscópicas y microscópicas con las claves detalladas dicotómicas o taxonómicas de Barnett (1983) y Hunter (1998) junto con Leslie y summerell (2006).

### **2.7.2 Bacterias**

Se determinaron dos características bioquímicas de las bacterias seleccionadas como catalasa y oxidasa (Anexo 1). También para diferenciar algunos géneros de microorganismos Gram negativos se empleó el esquema descrito por Shaad, Jones and Chun usando medios de cultivo artificiales. Para bacterias del género *Xanthomonas* se empleó agar YDC (Yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>), las bacterias al crecer en este medio producen un pigmento amarillo llamado xantomonadina que les confiere a las colonias un color amarillo (Castaño y Del Río, 1997). Por otro lado, para diferenciar a *Erwinia carotovora* causante de la pudrición blanda, se evaluó su actividad pectinolítica, utilizando tubérculos sanos de papa. Así, se cortaron rodajas de papa de 2 cm de grosor, luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% por 1 minuto y posteriormente se enjuagaron con agua estéril por tres veces. Seguidamente se sembraron en la superficie de la papa cada una de las bacterias a evaluar y colocando en una caja de petri estéril a manera de cámara húmeda, se llevaron a incubar a 28°C durante 48 a 72 horas de acuerdo al

protocolo referido por Kutsman, (2004) la actividad positiva se identificó observando oxidación de fenoles o de putrefacción color café, blanco-crema o amarillento alrededor del sitio de inoculación y olor desagradable. Para el género *Pseudomonas* se realizaron aislamientos en agar King B para visualizar la producción de pigmentos fluorescentes azul-verdoso tipo piocianina.

## Resultados

### 3.1 Aislamientos Microbianos

En plantas de papayuela de aproximadamente 6 meses de edad con síntomas de pudrición vascular, se tomaron muestras de exudados y tallos infectados a los cuales se les aplicaron los protocolos de aislamiento de fitopatógenos, de este proceso se obtuvieron 4 aislamientos de hongos y 17 aislamientos bacterianos. A cada microorganismos aislado se le asignó un código así:

- La letra inicial indica que pertenece al cultivo de papayuela (P)
- Las dos letras siguientes corresponden al municipio de muestreo (Ra: Ramiriquí, Ma: Maripí, So:Sotaquirá, C: Cómbita).
- La letra siguiente indica el órgano del cual se obtuvo la muestra (T: Tallo, E: exudado, MT: muestra tallo, DT: directo tallo, ET: exudado tallo, ED: exudado directo, CH: cámara húmeda)
- Número o letra minúscula corresponde al aislamiento que se seleccionó de la misma caja de Petri.

En este estudio, el aislamiento PSoE01 se excluyó por presentar una reacción positiva a la tinción de Gram y no ser parte del grupo de los microorganismos causante de marchitez vascular, las demás bacterias mostraron una coloración Gram negativa y respuesta positiva a solubilidad con KOH 3%, en la Tabla 1 se muestra el resumen de estos hallazgos.

**Tabla 1.***Resumen de los aislamientos bacterianos.*

<i>N°</i>	<i>Aislamiento</i>	<i>ORIGEN</i>	<i>Órgano</i>	<i>Tinción de Gram</i>	<i>Solubilidad KOH 3%</i>
1	<i>PRaT03</i>	Ramiriquí	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
2	<i>PRaT05</i>	Ramiriquí	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
3	<i>PRaE07</i>	Ramiriquí	Exudado	Bacilos Gram negativos	Positiva
4	<i>PRaE07a</i>	Ramiriquí	Exudado	Bacilos Gram negativos	Positiva
5	<i>PRaE07b</i>	Ramiriquí	Exudado	Bacilos Gram negativos	Positiva
6	<i>PSoT01</i>	Sotaquirá	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
7	<i>PSoT02</i>	Sotaquirá	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
8	<i>PSoE01</i>	Sotaquirá	Exudado	Bacilos Gram Positivos	Negativa
9	<i>PSoE02</i>	Sotaquirá	Exudado	Bacilos Gram negativos	Positiva
10	<i>PSoE03</i>	Sotaquirá	Exudado	Bacilos Gram negativos	Positiva
11	<i>PMaMT1</i>	Maripì	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
12	<i>PMaMT2</i>	Maripì	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
13	<i>PMaDT1</i>	Maripì	Tallo	Bacilos Gram Negativos	Positiva
14	<i>PMaDT2</i>	Maripì	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
15	<i>PCDT</i>	Cómbita	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
16	<i>PCET</i>	Cómbita	Tallo	Bacilos Gram negativos	Positiva
17	<i>PCED</i>	Cómbita	Exudado	Bacilos Gram Negativos	Positiva

*Nota. Autor*

En el municipio de Ramiriquí se aisló un hongo obtenido de tallo en cámara húmeda etiquetado como PRaCH (figura 11), 2 bacterias aisladas de tallo y 3 bacterias de exudado

identificadas como PRaT03 (tallo), PRaT05 (tallo), PRaE07 (exudado), PRaE07a (exudado), PRaE07b (exudado).

**Figura 11.**

*Muestra de tallo de Ramiriquí, cámara húmeda hongo PRaCH.*



*Nota.* Archivo fotográfico personal, Ing. Mónica Patiño 2022

En el municipio de Sotaquirá se aisló un hongo obtenido desde cámara húmeda de tallo el cual se identificó como PSoCH, 2 bacterias aisladas de tallo y 3 bacterias de exudado identificadas como PSoT01 (tallo), PSoT02 (tallo), PSoE01(exudado), PSoE02 (exudado), PSoE03 (exudado).

En Maripí se aisló un hongo obtenido desde cámara húmeda de tallo el cual se identificó como PMaCH (figura 12), 2 bacterias aisladas de tallo identificadas como PMaMT1, PMaMT2 y 2 bacterias de exudado PMaDT1, PMaDT2.

**Figura 12.**

*Muestra de tallo de Maripí, cámara húmeda hongo P<sub>Ma</sub>CH.*



**Nota.** Archivo fotográfico personal, 2022.

En Cóbbita se aisló un hongo obtenido desde la porción de tallo desinfectado el cual se identificó como PCTD, una bacteria aislada de tallo identificada como PCDT y 2 bacterias de exudado PCET y PCED. En la tabla 2 se relaciona el resumen de los hongos aislados en las muestras de los cuatro municipios.

**Tabla 2.**

*Resumen de los aislamientos de hongos.*

<b>Aislamiento</b>	<b>Origen</b>	<b>Órgano</b>
<b>PRaCH</b>	Ramiriquí	Tallo (Cámara húmeda)
<b>PSoCH</b>	Sotaquirá	Tallo (Cámara húmeda)
<b>PMaCH</b>	Maripí	Tallo (Cámara húmeda)
<b>PCTD</b>	Cóbbita	Tallo (cultivo directo en agar PDA)

*Nota.* Autor

### **3.2 Clasificación de los Aislamientos Según su Actividad Enzimática en Medios de Cultivo con Lignina y Celulosa.**

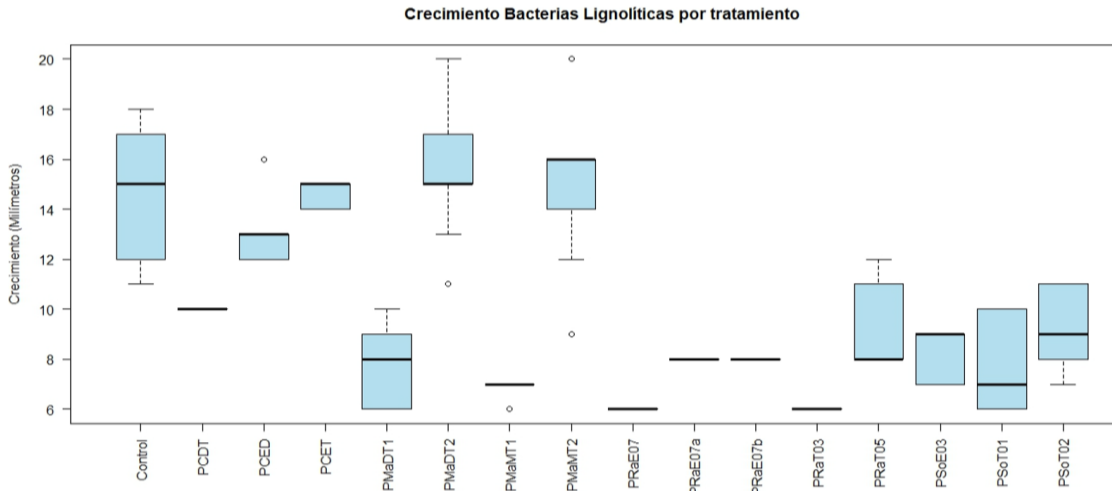
A continuación, se presentan los resultados de la observación directa y medición del crecimiento microbiano que permitieron valorar cualitativa y cuantitativamente la actividad enzimática patogénica de degradación de lignina y celulosa de 17 bacterias y 5 hongos, los cuales se presentan en la Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente.

#### **3.2.1 Evaluación en Agar Lignina**

**3.2.1.1 Actividad Ligninolítica Bacteriana.** Inicialmente se presentan algunas medidas descriptivas del crecimiento por aislamiento para las bacterias ligninolíticas a las 72 horas. Se puede apreciar que los tratamientos PMaDT2, PMaMT2, PCET, PCED y el control positivo (*Ralstonia* sp.) presentaron los mayores promedios en cuanto al crecimiento bacteriano, junto con la mayor variabilidad entre las réplicas, en la siguiente gráfica 1, se puede apreciar lo mencionado anteriormente, estos resultados mostraron que los promedios del crecimiento presentan diferencias, sin embargo, más adelante se verificó si estas diferencias son significativas.

### Gráfica 1.

Crecimiento en milímetros de bacterias en agar lignina.



Nota. Los Aislamientos PMA DT2, PMA MT2, PCET, PCED y Control positivo (*Ralstonia* sp.) con mayor crecimiento.

De acuerdo a la prueba de Shapiro - Wilk los datos de crecimiento de los aislamientos bacterianos a las 72 horas no siguen una distribución normal, sin embargo se realiza análisis de varianza a fin de identificar si las diferencias entre los promedios de los tratamientos son significativas o no.

```
Shapiro-Wilk normality test
data:  CRECIMIENTO
W = 0.88822, p-value = 0.000000002307
```

El análisis de varianza muestra que los promedios de los tratamientos difieren significativamente en al menos un par de promedios de los sistemas (p-valor inferior al 5%), con lo cual se rechaza la hipótesis nula (H<sub>0</sub>).

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TRATAMIENTO	16	1638.1	102.38	38.37	<2e-16 ***
Residuals	136	362.9	2.67		

---  
Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Para identificar la procedencia de estas diferencias se plantea la prueba de Duncan, la cual está encaminada a determinar qué parejas de medias difieren significativamente, los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3, en la cual se organizaron los datos en 4 grupos, clasificando su actividad ligninolítica entre alta, media, baja y sin actividad enzimática. El primer grupo integrado por los aislamientos PMaDT2, PMaMT2, PCET y PCED tuvo una alta actividad enzimática ligninolítica muy similar al control positivo, que corresponde a *Ralstonia* sp. El segundo grupo conformado por PSoE02, PCDT, PRaT05, mostraron un comportamiento intermedio con diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo antes mencionado. Los aislamientos del tercer grupo PSoT02, PSoE03, PRaE07a, PRaE07b, PMaDT1, evidenciaron una actividad muy baja en contraste con los demás grupos evaluados con diferencias altamente significativas. Continuando con el análisis, también se encontró que el cuarto grupo constituido por PRaT03 y PRaE07 no presentaron ninguna actividad enzimática con diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 3.**

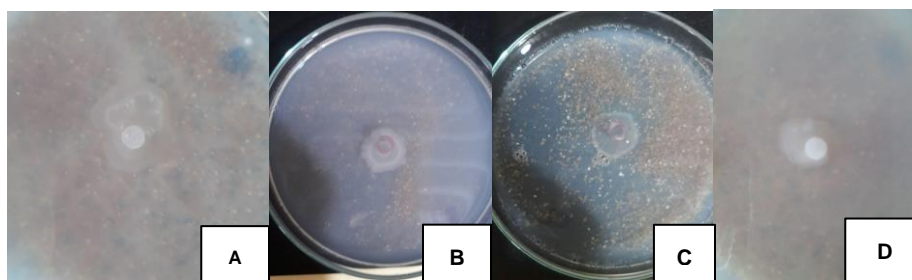
*Crecimiento bacteriano en agar lignina.*

ENZIMAS EXTRACELULARES LIGNOLÍTICAS			
Aislamiento	Crecimiento	Group	Clasificación
PMaDT2	15.888.889	a	Alta
PMaMT2	15.222.222	a	
PCET	14.666.667	ab	
Control positivo (Ralstonia sp.)	14.666.667	ab	
PCED	13.333.333	b	
PSoE02	10.111.111	c	Media
PCDT	10.000.000	cd	
PRaT05	9.222.222	cde	
PSoT02	8.444.444	def	
PSoE03	8.333.333	ef	
PRaE07a	8.000.000	ef	Baja
PRaE07b	8.000.000	ef	
PMaDT1	7.888.889	ef	
PSoT01	7.666.667	ef	
PMaMT1	6.888.889	fg	
PRaT03	6.000.000	g	Sin Actividad
PRaE07	6.000.000	g	

*Nota.* Grupos con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas, grupos con letras iguales no poseen diferencias estadísticas.

De acuerdo a la prueba anterior se identifica que los crecimientos de los aislamientos PMaMT2 y PMaDT2 difieren significativamente de los demás tratamientos y son superiores significativamente en su actividad ligninolítica. Por lo tanto, se seleccionaron las colonias PMaMT2 y PMaDT2, además de las colonias PCET Y PCED por tener una alta actividad enzimática. Por lo tanto se realizaron pruebas preliminares de clasificación para género según el esquema descrito por Shaad, Jones and Chun y pruebas bioquímicas. Los demás aislamientos, no continuaron siendo analizados en esta fase del proyecto.

**Figura 13.** Crecimiento de bacterias en agar lignina.

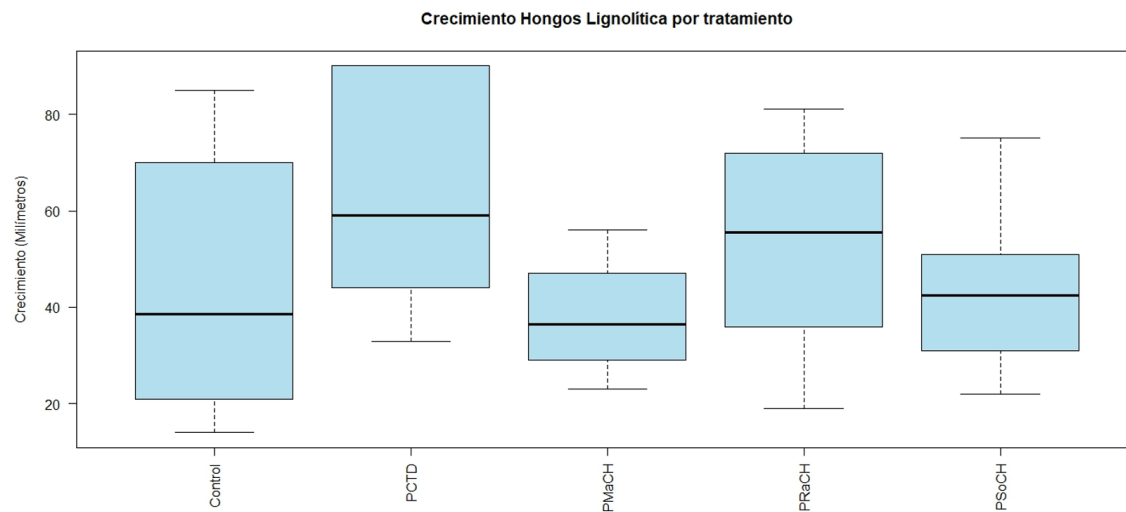


*Nota.* **A.** Control positivo *Ralstonia* sp. **B.** PMAmT2 **C.** PMAmDT2 **D.** PCED. Fuente. Archivo fotográfico personal, 2022.

**3.2.1.2 Actividad Ligninolítica de los Hongos.** También, para este grupo en principio se presentan algunas medidas descriptivas de su crecimiento por aislamiento al día 7. Se puede apreciar que los aislamientos PCTD y PRaCH muestran los mayores promedios en cuanto a su desarrollo en agar lignina. El Control positivo (*Pleurotus ostreatus*) tuvo la mayor variabilidad entre las mediciones de las réplicas. En la gráfica 2, se puede observar lo mencionado anteriormente, estos resultados indican que los promedios del crecimiento presentan diferencias, sin embargo, más adelante se verifica si estas diferencias son significativas.

## Gráfica 2.

*Crecimiento fúngico en milímetros en agar lignina.*



*Nota.* Aislamientos PCTD y PRaCH muestran el mayor desarrollo.

De la misma forma como se procedió con las bacterias, para evaluar la actividad ligninolítica de los hongos se realizó el test de Shapiro - Wilk, determinando que los datos de crecimiento no siguen una distribución normal, sin embargo se realiza análisis de varianza a fin de identificar si las diferencias entre los promedios de los tratamientos son significativas o no.

```
Shapiro-Wilk normality test
data:  CRECIMIENTO
W = 0.94578, p-value = 0.0009276
```

El análisis de varianza muestra que los promedios de los aislamientos en el día 7 de crecimiento, difieren significativamente en al menos un par de los promedios (p-valor inferior al 5%), con lo cual se rechaza la hipótesis nula (H<sub>0</sub>). Para identificar tales diferencias se realiza la prueba de Duncan, los resultados se presentan a continuación en la Tabla 4.

**Tabla 4.**

*Crecimiento fúngico en agar Lignina.*

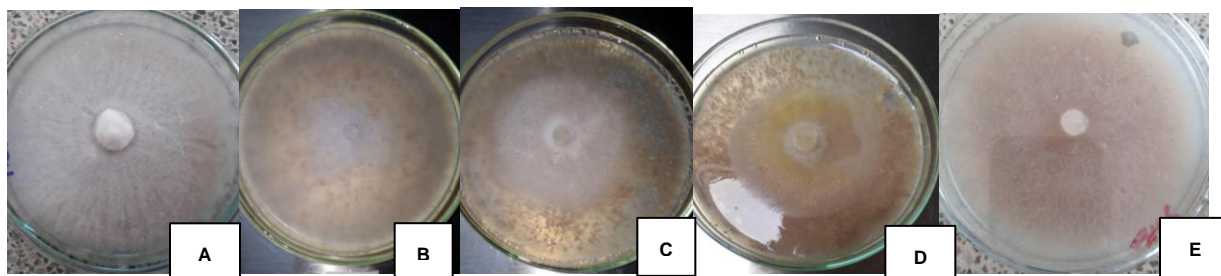
ENZIMAS EXTRACELULARES LIGNINOLÍTICAS		
Aislamiento		Crecimiento
PCTD	62.66667	a
PRaCH	53.16667	ab
CONTROL POSITIVO ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	44.33333	bc
PSoCH	44.05556	bc
PMaCH	38.05556	c

*Nota.* Grupos con letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas, grupos con letras iguales no poseen diferencias estadísticas.

Con la prueba de Duncan se estableció que el crecimiento del aislamiento PCTD es significativamente superior al crecimiento de los hongos PSoCH, PMaCH y al control positivo que en este caso fue *Pleurotus ostreatus*, pero no difiere significativamente del PRaCH que también tiene una alta actividad ligninolítica. Los hongos PSoCH, PMaCH y el control positivo presentaron un comportamiento similar (ver figura 14). Por lo tanto, se seleccionaron todos los aislamientos fúngicos y se les realizaron pruebas preliminares de clasificación taxonómica hasta género.

## Figura 14.

*Crecimiento de hongos en agar lignina.*



Nota. A. Control positivo *Pleurotus ostreatus* B. PRaCH. C. PSoCH D. PMaCH E. PCTD.

Fuente. Archivo fotográfico personal, 2022.

### 3.3.2 Evaluación en Agar Celulosa

**3.3.2.1 Actividad Celulolítica Bacteriana.** Los datos de crecimiento de la actividad celulolítica bacteriana a las 72 horas se someten a prueba de Shapiro - Wilk, en la cual se determina que estos no siguen una distribución normal, sin embargo se realiza análisis de varianza a fin de identificar la existencia de diferencias estadísticas entre ellos. Los resultados del análisis de varianza muestran la existencia de diferencias significativas en al menos un par de los tratamientos, con lo cual se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ). Para identificar dicha diferencia se aplica la prueba de Duncan, con la cual se determinan que parejas de medias difieren significativamente, tal como se muestran en la Tabla 5, donde el crecimiento promedio entre *Ralstonia* sp (control positivo) y el resto de los aislamientos difieren significativamente, es decir, existe diferencia estadística significativa. Las bacterias PMaMT2, PMaDT2, PSoT01 y PSoE02 tienen un crecimiento intermedio y las demás no registran crecimiento, además, ninguna de las bacterias evaluadas después de aplicar rojo congo, evidenciaron halos de hidrólisis en contraste con el control positivo (ver figura 15), por lo tanto ningún aislamiento es celulolítico.

**Tabla 5.**

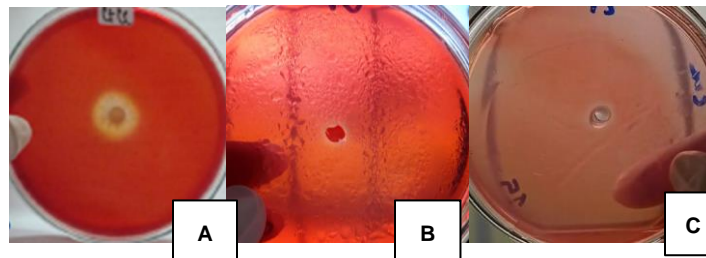
*Crecimiento bacteriano en agar celulosa.*

<b>Aislamiento</b>	<b>Crecimiento</b>	<b>Group</b>
Control positivo ( <i>Ralstonia</i> sp.)	17,66667	a
<b>PMaMT2</b>	15,00000	b
<b>PMaDT2</b>	10,33333	c
<b>PSoT01</b>	10,33333	c
<b>PSoE02</b>	10,00000	c
<b>PRaT03</b>	5,00000	d
<b>PMaMT1</b>	5,00000	d
<b>PMaDT1</b>	5,00000	d
<b>PCDT</b>	5,00000	d
<b>PCET</b>	5,00000	d
<b>PCED</b>	5,00000	d
<b>PRaT05</b>	5,00000	d
<b>PRaE07</b>	5,00000	d
<b>PRaE07a</b>	5,00000	d
<b>PRaE07b</b>	5,00000	d
<b>PSoT02</b>	5,00000	d
<b>PSoE03</b>	5,00000	d

*Nota.* Las letras desiguales representan diferencias altamente significativas y las letras similares tienen un comportamiento parecido.

**Figura 15.**

*Crecimiento bacteriano de los aislamientos en agar celulosa*



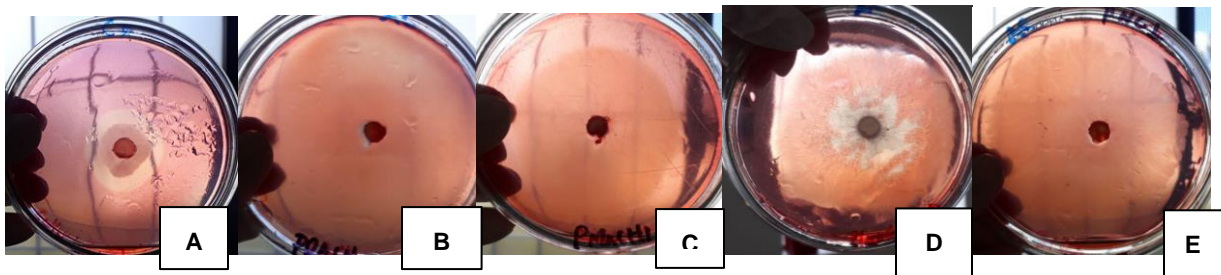
*Nota.* **A.** Control positivo *Ralstonia* sp. con halo de hidrólisis **B.** PMaMT2 sin halo de hidrólisis

**C.** PMaDT2 sin halo de hidrólisis. Fuente: archivo fotográfico personal, Mónica Patiño, 2022.

**3.3.2.2 Actividad Celulolítica de Hongos.** Los datos de crecimiento de la actividad celulolítica fúngica en el día 7 de crecimiento días se someten a prueba de Shapiro - Wilk, en la cual se determina que estos no siguen una distribución normal, sin embargo se realiza análisis de varianza a fin de identificar la existencia de diferencias estadísticas entre ellos. Los resultados del análisis de varianza muestran la existencia de diferencias significativas en al menos un par de los aislamientos, con lo cual se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ). Para identificar dicha diferencia se aplica la prueba de Duncan, con la cual se determinan que parejas de medias difieren significativamente, tal como se muestran en la Tabla 6, donde el crecimiento promedio entre PRaCH, PSoCH, PMaCH y PCDT y el control positivo que es *Pleurotus ostreatus* difieren significativamente, es decir, existe diferencia estadística significativa. Se pudo identificar que el crecimiento de los hongos es significativamente diferente en cada uno de los aislamientos, siendo la colonia PRaCH superior a los demás y la colonia PSoCH inferior a los demás hongos, sin embargo, ninguno de los microorganismos evaluados después de aplicar rojo congo, mostraron halos de hidrólisis en contraste con el control positivo (ver figura 16), por lo tanto, ningún aislamiento es celulolítico.

**Figura 16.**

Crecimiento de los aislamientos micóticos sin halo de hidrólisis en agar celulosa.



Nota. **A.** Control positivo *Pleurotus ostreatus* con halo de hidrólisis **B.** PRaCH sin halo de hidrólisis. **C.** PSoCH sin halo de hidrólisis **D.** PMaCH sin halo de hidrólisis **E.** PCTD sin halo de hidrólisis. Fuente. Archivo fotográfico personal, 2022

**Tabla 6.**

*Crecimiento fúngico en agar celulosa.*

<b>Aislamiento</b>	<b>Crecimiento</b>	<b>Group</b>
<b>PRaCH</b>	80.66667	a
<b>PCTD</b>	73.66667	b
<b>PSoCH</b>	69.33333	c
<b>PMaCH</b>	63.66667	d
<b>CONTROL POSITIVO (<i>Pleurotus ostreatus</i>)</b>	32.00000	e

Nota. Las letras desiguales representan diferencias altamente significativas y las letras similares tienen un comportamiento parecido.

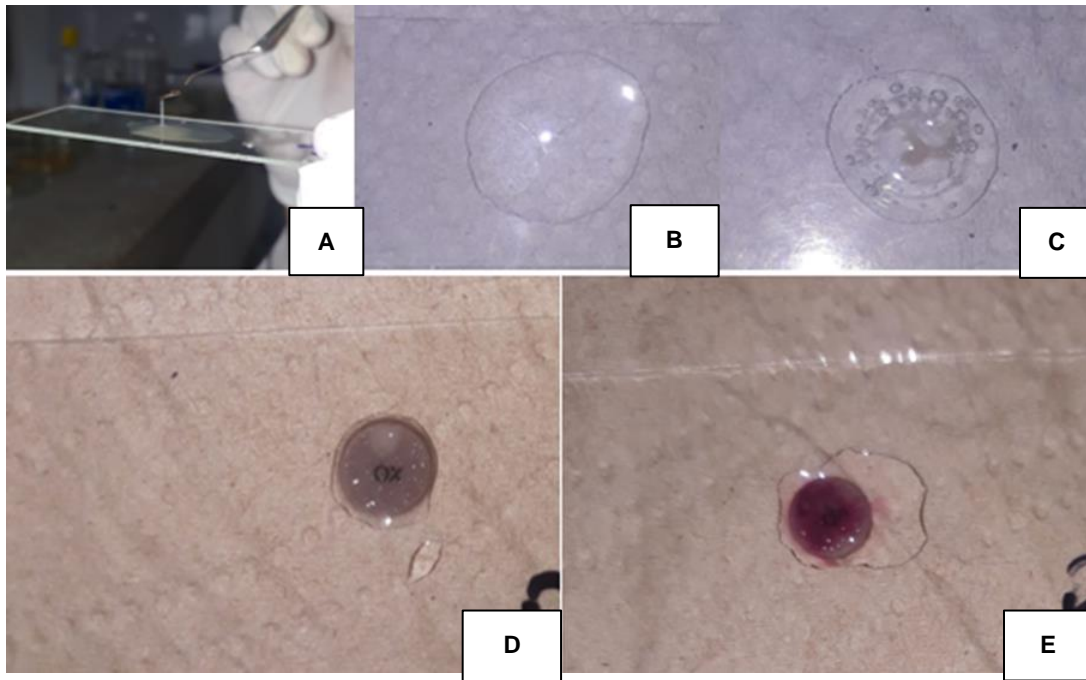
## **4.1 Identificación Morfológica y Bioquímica**

### **4.1.1 Bacterias**

Se identificaron tres de los cuatro aislamientos bacterianos (*PMaMT2*, *PMaDT2*, y *PCED*) porque en el transcurso de la investigación el cuarto aislamiento (*PCET*) presentó un alto grado de contaminación el cual fue imposible recuperar, los demás fueron bacilos Gram negativos confirmado con solubilidad positiva en KOH 3%. De acuerdo a las pruebas de selección descritas por Shaad y Kutsman, (2004) en este grupo no se identificaron bacterias de los géneros *Xanthomonas*, *Erwinia* o *Pseudomonas* y tuvieron reacciones variables a las pruebas de catalasa y oxidasa. En la figura 17 se muestran las pruebas de KOH 3% positiva, pruebas bioquímicas, catalasa y oxidasa con reacción positiva y negativa.

**Figura 17.**

*Características bioquímicas bacterianas evaluadas.*



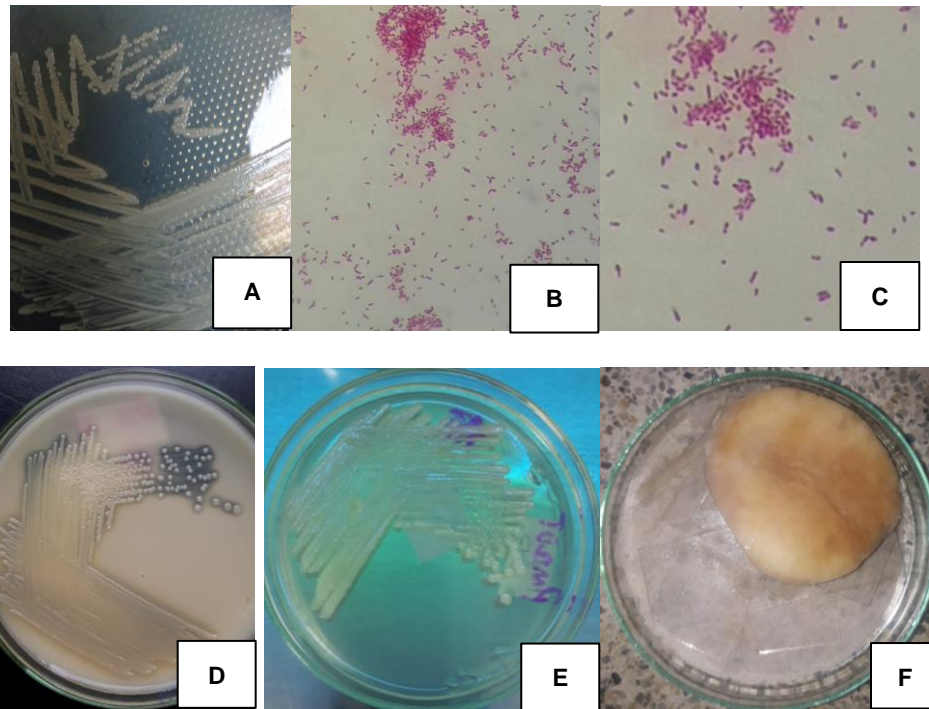
*Nota.* **A.** Reacción positiva a la solubilidad con KOH 3%. **B.** Reacción Catalasa negativa **C.** Reacción Catalasa positiva. **D.** Reacción Oxidasa negativa. **E.** Reacción Oxidasa positiva.

Fuente. Archivo fotográfico personal, 2022.

**Aislamiento bacteriano P<sub>Ma</sub>MT<sub>2</sub>:** como se observa en la figura 18 las colonias de este aislamiento eran grandes, lisas, de bordes regulares, color crema, con olor fétido. A la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos cortos gruesos, crecimiento sin pigmentos amarillos en agar YDC, crecimiento sin pigmentos fluorescentes en agar KING B y sin actividad pectinolítica en tubérculos de papa.

**Figura 18.**

*Características macroscópicas y microscópicas de la colonia P<sub>Ma</sub>MT2.*

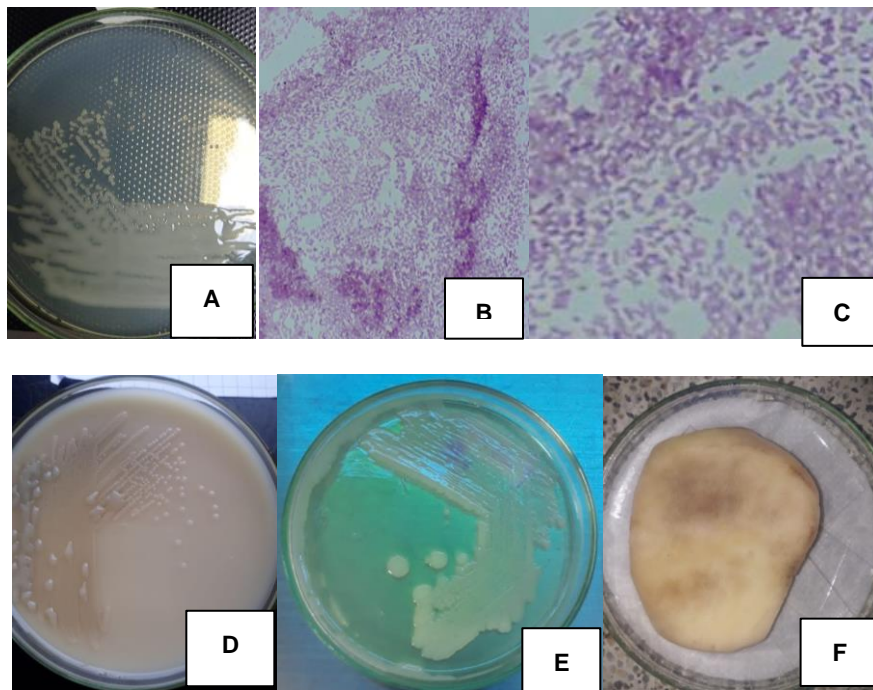


*Nota.* **A.** Aislamiento en agar Nutritivo. **B.** Bacilos Gram negativos cortos gruesos objetivo 100X en aceite de inmersión. **C.** Zoom de bacilos Gram negativos cortos gruesos. **D.** Crecimiento en agar YDC para *Xanthomonas* sin pigmentos. **E.** Crecimiento en agar King B para *Pseudomonas* sin pigmentos. **F.** Actividad pectinolítica negativa en tubérculos de papa para *Erwinia carotovora*. Fuente: Archivo fotográfico personal, 2022.

**Aislamiento bacteriano P<sub>Ma</sub>DT2:** como se observa en la figura 19 las colonias de este aislamiento eran grandes, mucilaginosas, de bordes irregulares, color crema. A la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos cortos delgados, crecimiento sin pigmentos amarillos en agar YDC, crecimiento sin pigmentos fluorescentes en agar KING B y sin actividad pectinolítica en tubérculos de papa.

**Figura 19.**

*Características macroscópicas y microscópicas de la colonia P<sub>MaDT2</sub>.*



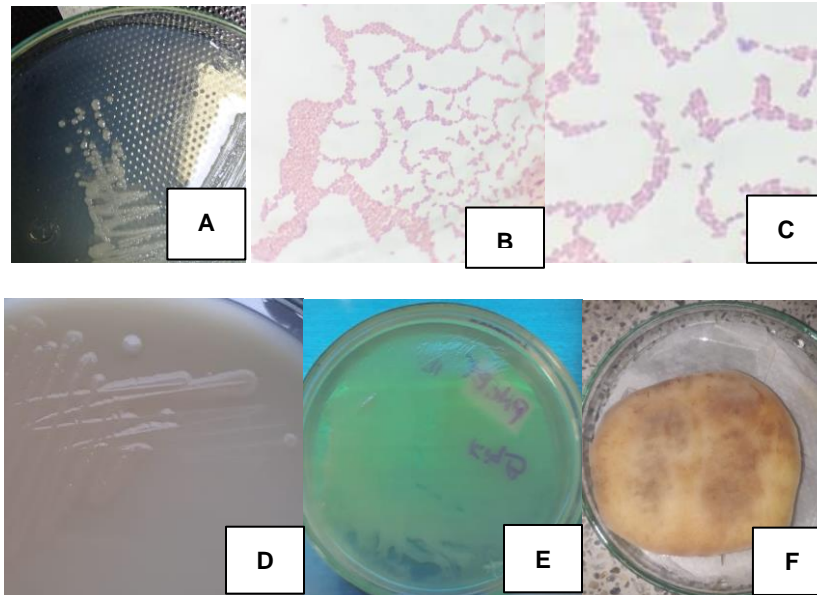
*Nota.* **A.** Aislamiento en agar Nutritivo. **B.** Bacilos Gram negativos cortos delgados objetivo 100X en aceite de inmersión. **C.** Zoom de bacilos Gram negativos cortos. **D.** Crecimiento en agar YDC para *Xanthomonas* sin pigmentos. **E.** Crecimiento en agar King B para *Pseudomonas* sin pigmentos. **F.** Actividad pectinolítica negativa en tubérculos de papa para *Erwinia carotovora*.

Fuente: Archivo fotográfico personal, 2022.

**Aislamiento bacteriano PCED:** como se observa en la figura 20 las colonias de este aislamiento eran medianas, bordes regulares, color crema, con olor fétido. A la tinción de Gram se observaron bacilos Gram negativos cortos gruesos, crecimiento sin pigmentos amarillos en agar YDC, crecimiento sin pigmentos fluorescentes en agar KING B y sin actividad pectinolítica en tubérculos de papa. En la tabla 7 se relaciona el resumen de las pruebas de selección y pruebas bioquímicas de los aislamientos seleccionados.

**Figura 20.**

*Características macroscópicas y microscópicas de la colonia PCED.*



Nota. **A.** Aislamiento en agar Nutritivo. **B.** Bacilos Gram negativos cortos gruesos objetivo 100X en aceite de inmersión. **C.** Zoom de bacilos Gram negativos cortos. **D.** Crecimiento en agar YDC para *Xanthomonas* sin pigmentos. **E.** Crecimiento en agar King B para *Pseudomonas* sin pigmentos. **F.** Actividad pectinolítica negativa en tubérculos de papa para *Erwinia carotovora*.

Fuente: Archivo fotográfico personal, 2022.

**Tabla 7.**

*Resumen pruebas de selección bioquímica en bacterias.*

<b>PRUEBA</b>	<b>PMaMT2</b>	<b>PMaDT2</b>	<b>PCED</b>	<b>Respuesta Bacterias fitopatógenas</b>		
<b>Origen</b>	<b>Maripí</b>	<b>Maripí</b>	<b>Cómbita</b>	<i>Pseudomonas</i> <b>sp.</b>	<i>Xanthomonas</i> <b>sp.</b>	<i>Erwinia</i> <b>sp.</b>
<b>Afinidad al Gram</b>	<b>Negativa</b>	<b>Negativa</b>	<b>Negativa</b>	<b>Negativa</b>	<b>Negativa</b>	<b>Negativa</b>
<b>Confirmación KOH 3%</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
<b>Forma bacteriana</b>	<b>Bacilar</b>	<b>Bacilar</b>	<b>Bacilar</b>	<b>Bacilar</b>	<b>Bacilar</b>	<b>Bacilar</b>
<b>Catalasa</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Oxidasa</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Medio YDC</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>Medio King B</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Pectinasa</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Olor</b>	<b>Suave</b>	<b>Fuerte</b>	<b>Fuerte</b>	<b>Suave</b>	<b>Suave</b>	<b>Fuerte</b>

*Nota.* Autor

#### **4.1.2 Hongos**

A partir de las muestras de tallos de las plantas afectadas en los diferentes municipios en Boyacá, se hizo selección de cuatro hongos con una mayor actividad enzimática que corresponden a: PRaCH, PSoCH, PMaCH y PCTD, fueron identificados teniendo en cuenta los estándares internacionales y sus características morfo culturales como hongos del género *Fusarium*. Sus rasgos macroscópicos en agar papa dextrosa (PDA) fueron variables por tipo de micelio y su pigmentación. También se encontraron algunas diferencias en la morfología microscópica de las células conidiógenas como la forma y tamaño de los microconidios y

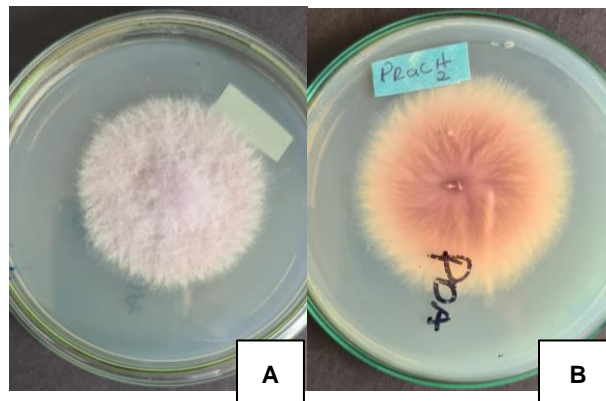
macroconidios. De igual manera se observaron diferencias en el arreglo y forma de las clamidosporas.

### **Aislamiento de Ramiriquí PRaCH:**

**Características macroscópicas:** El aislamiento PRaCH, en el medio PDA mostró un color de la colonia en el anverso fue blanco-magenta y por el reverso se observó pigmentos difusibles color púrpura en el centro de la colonia. Abundante micelio aéreo de aspecto flocoso (figura 21 muestra el micelio en agar PDA).

#### **Figura 21.**

*Micelio del aislamiento de Ramiriquí PRaCH en agar PDA.*

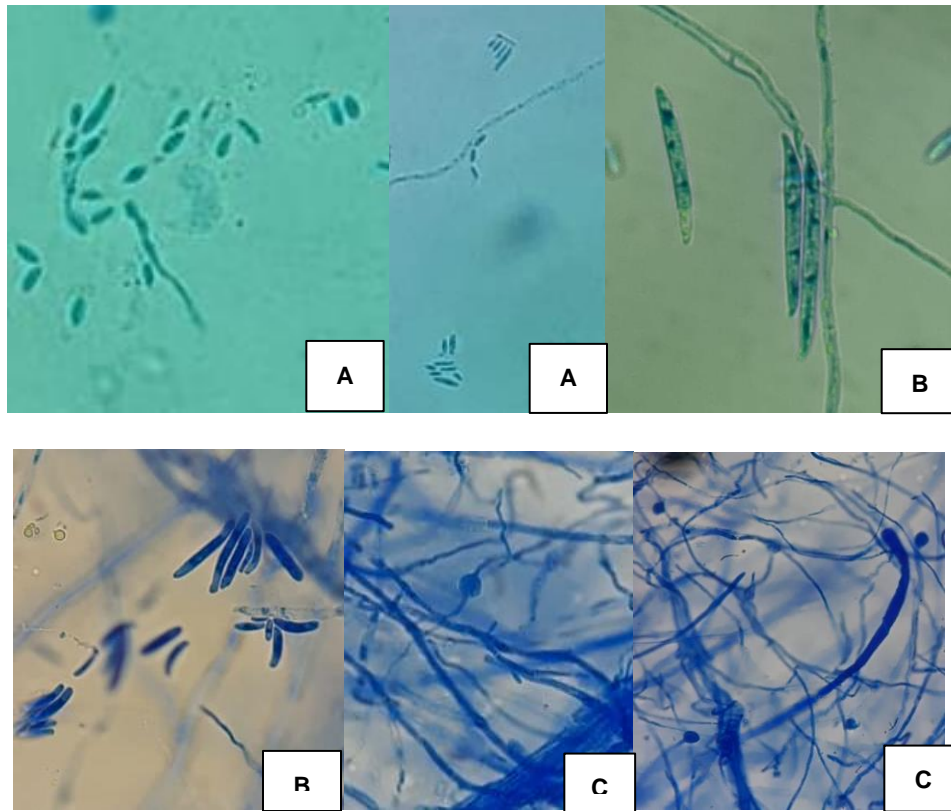


*Nota. A. Anverso. B. Reverso. Archivo fotográfico personal, Ing. Jorge Fonseca, 2023*

**Características microscópicas:** se observaron microconidios hialinos de forma oval o elíptica sin septos. Los macroconidios eran hialinos en forma falciforme y de bote ligeramente puntiagudo al final y delgados con 2 a 3 septos. Las clamidosporas eran de forma globosa y solitaria, el arreglo era intercalar dentro del micelio y en la parte terminal del micelio (figura 22 macroconidios, microconidios y clamidosporas con objetivo de 40x).

**Figura 22.**

*Células conidiógenas del aislamiento de Ramiriquí PRaCH*



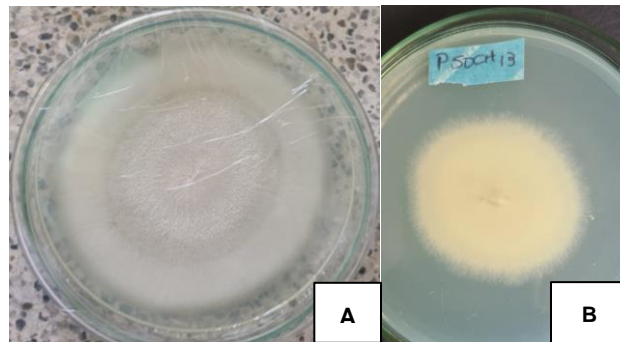
*Nota.* Objetivo de 40X. **A.** Microconidios. **B.** Macroconidios. **C.** Clamidosporas. Fuente. Archivo fotográfico personal, Ing. Jorge Fonseca y autora, 2023.

#### **Aislamiento de Sotaquirá PSoCH:**

**Características macroscópicas:** El color de la colonia en el anverso y reverso fue blanco, no se observaron pigmentos. Escaso micelio aéreo de aspecto aterciopelado y húmedo (figura 23 muestra el micelio en agar PDA).

**Figura 23.**

*Micelio del aislamiento de Sotaquirá PSoCH en agar PDA*

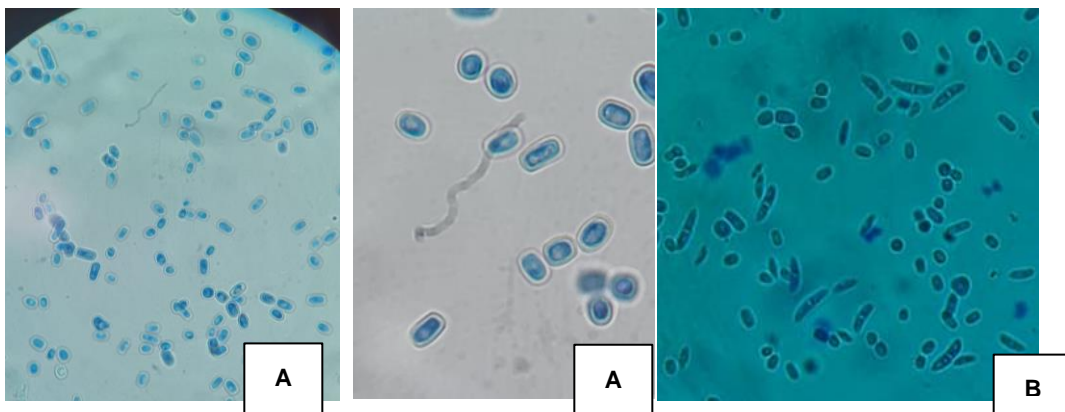


*Nota.* **A.** Anverso. **B.** Reverso. Fuente. Archivo fotográfico personal, Ing. Jorge Fonseca y autora, 2023.

**Características microscópicas:** se observaron microconidios hialinos de forma cilíndrica u oval sin septos. Los macroconidios eran hialinos abundantes cortos, robustos, redondeados y curvados con 2 septos. No se observaron clamidosporas (figura 24 macroconidios, microconidios con objetivo de 40x).

**Figura 24.**

*Células conidiógenas del aislamiento de Sotaquirá PSoCH*



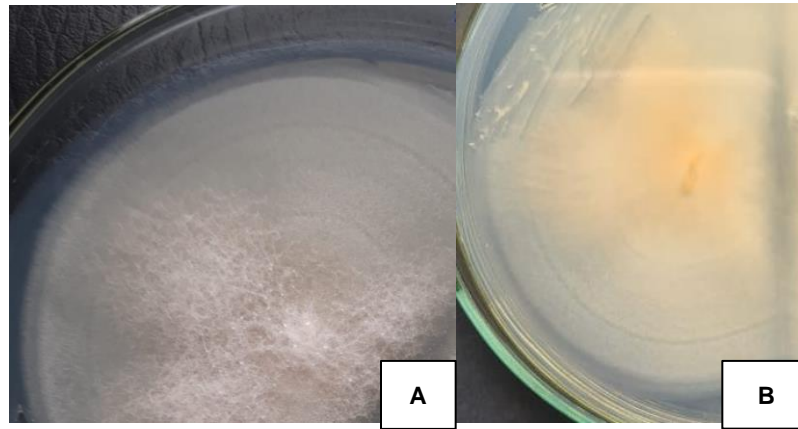
*Nota.* Objetivo de 40X. **A.** Microconidios. **B.** Macroconidios. Fuente. Archivo fotográfico personal, Ing. Jorge Fonseca y autora, 2023.

### **Aislamiento de Maripí P<sub>Ma</sub>CH:**

**Características macroscópicas:** El color de la colonia en el anverso fue blanco-crema y por el reverso blanco-amarillento no se observaron pigmentos difusibles. Escaso micelio aéreo de aspecto aterciopelado (figura 25 muestra el micelio en agar PDA).

#### **Figura 25.**

*Micelio del aislamiento de Maripí P<sub>Ma</sub>CH en agar PDA*

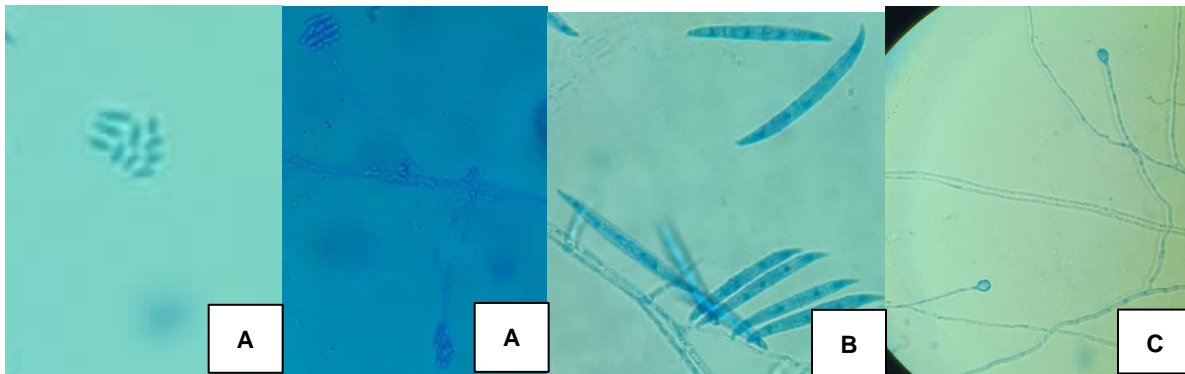


*Nota.* **A.** Anverso. **B.** Reverso. Fuente. Archivo fotográfico personal, Ing. Jorge Fonseca y autora, 2023.

**Características microscópicas:** se observaron microconidios hialinos de forma elíptica sin septos. Macroconidios hialinos, abundantes, en forma falciforme, puntiagudos y delgados con 3 a 4 septos. Las clamidosporas eran de forma globosa y solitaria, el arreglo era en la parte terminal del micelio (figura 26 macroconidios, microconidios y clamidosporas con objetivo de 40x).

**Figura 26.**

*Células conidiógenas del aislamiento de Maripí PMACh*



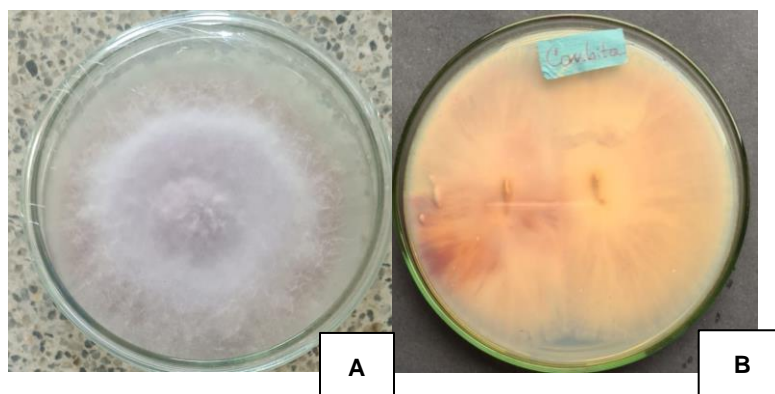
*Nota.* Objetivo de 40X. **A.** Microconidos. **B.** Macroconidos. **C.** Clamidosporas. Fuente. Archivo fotográfico personal, Ing. Jorge Fonseca y autora, 2023.

#### **Aislado de Cómbita PCTD:**

**Características macroscópicas:** El color de la colonia en el anverso fue blanco-magenta y por el reverso se observó pigmentos difusibles color púrpura que aparecían con el tiempo. Abundante micelio aéreo de aspecto algodonoso (figura 27 muestra el micelio en agar PDA).

**Figura 27.**

Micelio del aislamiento de Cómbita PCTD en agar PDA.

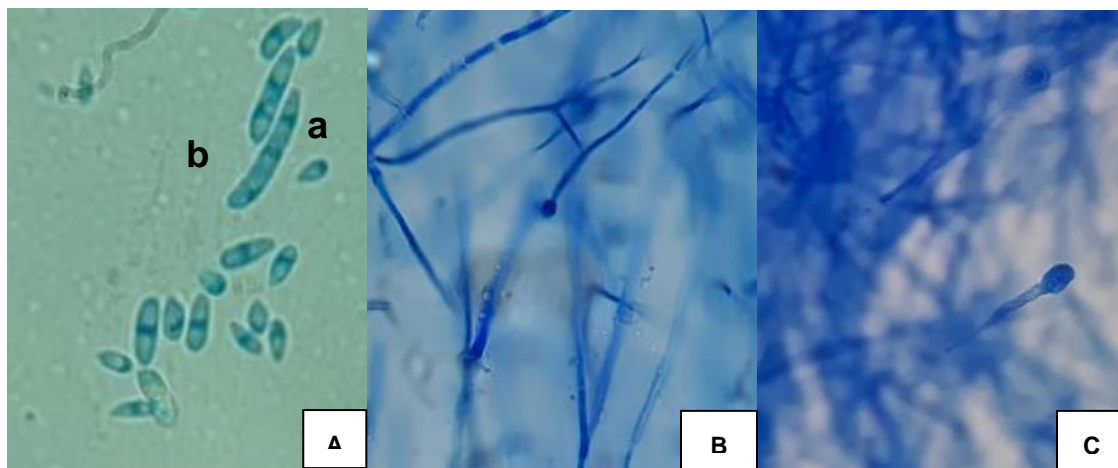


*Nota.* **A.** Anverso. **B.** Reverso. Fuente. Archivo fotográfico personal, Ing. Jorge Fonseca y autora, 2023

**Características microscópicas:** se observaron microconidios hialinos de forma ovalada sin septos y elíptica con 2 septos. Macroconidios hialinos robustos ligeramente rectos con 3 septos. Las clamidosporas eran de forma globosa y solitaria, el arreglo era en la parte terminal del micelio (figura 28 macroconidios, microconidios y clamidosporas con objetivo de 40x). En la tabla 8 se resumen las características macroscópicas y microscópicas de los cuatro hongos aislados.

**Figura 28.**

*Células conidiógenas del aislamiento de Cómbita PCTD.*



*Nota.* Objetivo de 40X. **A.** Conidios a. Microconidios b. Macroconidios. **B.** Clamidosporas.

Fuente. Archivo fotográfico personal, Ing. Jorge Fonseca, 2023.

A continuación en la tabla 8 se presenta el resumen de las características macroscópicas como el color del anverso y reverso de la colonia, el tipo de micelio y la forma de las conidias de los cuatro aislamientos fúngicos.

**Tabla 8.**

*Resumen de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas en hongos.*

<i>CARACTERÍSTICAS</i>		<i>PRaCH</i>	<i>PSoCH</i>	<i>PMaCH</i>	<i>PCTD</i>
<i>MACROSCÓPICAS</i>					
<b>Anverso</b>		<b>Blanco-magenta</b>	<b>Blanco</b>	<b>Blanco- crema</b>	<b>Blanco-magenta</b>
<b>Reverso</b>		<b>Pigmentos difusibles púrpura</b>	<b>Blanco sin pigmentos</b>	<b>Blanco-amarillento sin pigmentos</b>	<b>Pigmentos difusibles púrpura</b>
<b>Tipo de micelio</b>		<b>Copiosos flocoso</b>	<b>Escaso aterciopelado y húmedo</b>	<b>Escaso aterciopelado</b>	<b>Copiosos algodonoso</b>
<i>MICROSCÓPICAS</i>					
<b>Microconidios</b>	<b>Forma</b>	<b>Oval y elíptica</b>	<b>Cilíndrica y oval</b>	<b>Elíptica</b>	<b>Oval-Elíptica</b>
	<b># de septos</b>	<b>Sin septos</b>	<b>Sin septos</b>	<b>Sin septos</b>	<b>2</b>
<b>Macroconidios</b>	<b>Forma</b>	<b>Falciforme y de bote ligeramente puntiagudo</b>	<b>Robustos, redondeados y cortos</b>	<b>Falciforme puntiagudo</b>	<b>Robustos ligeramente rectos</b>
	<b># de septos</b>	<b>2 a 3</b>	<b>2</b>	<b>3 a 4</b>	<b>3</b>
<b>Clamidosporas</b>	<b>Forma</b>	<b>Globosa solitaria</b>	<b>No se observaron</b>	<b>Globosa solitaria</b>	<b>Globosa solitaria</b>
	<b>Ubicación en el micelio</b>	<b>Intercalar Terminal</b>	<b>No se observaron</b>	<b>Terminal</b>	<b>Terminal</b>
	<b>Género</b>	<b><i>Fusarium</i></b>	<b><i>Fusarium</i></b>	<b><i>Fusarium</i></b>	<b><i>Fusarium</i></b>

## Discusión

Según Agrios, (2012) varios miles de especies de hongos, centenares de especies de bacterias, nemátodos, distintos virus y viroides infectan las plantas cultivadas, por lo tanto, el parasitismo de las plantas es un evento bastante frecuente, por ejemplo, el maíz padece de 100 enfermedades, la papa tiene 200 patologías, un solo cultivo de tomate, es afectado por más de 80 clases de hongos, 11 bacterias, 16 virus y varios nematodos, por otro lado, según Maselli, (2010) y Latorre, (2018) el cultivo de papayuela es limitado por varios fitopatógenos que afectan: tallos, ramas, frutos y flores, causando grandes pérdidas en producción y rendimiento, para ilustrar, Robles, *et al.* (2017) y Guerrero, *et al.* (2016), refieren que este cultivo sufre de bacteriosis como el tumor del cuello causada por *Agrobacterium* sp. y pudrición radical ocasionada por *Erwinia* sp., también adolece de enfermedades fúngicas como la Cenicilla (*Oidium* sp.), lancha temprana por *Alternaria* sp., Antracnosis (*Mycosphaerella* sp.) y Marchitez Vascular (MV) por *Fusarium oxysporum*.

Para reafirmar, Ochoa *et al.* (2000) y Robles, *et al.* (2016) citaron que en Ecuador, este cultivo, presenta una alta incidencia de enfermedades ocasionadas por hongos como *Fusarium oxysporum*, encontrando que existe una gran variabilidad de rasgos morfológicos en los aislamientos del laboratorio y de acuerdo a la identificación molecular existen diferentes especies de *Fusarium* causando la marchitez vascular, por otra parte, en la región amazónica de Ecuador, Castro, *et al.* (2019) revelaron pérdidas económicas en el 80% de las plantaciones del frutal de la naranjilla (*Solanum quitoense*) que tenía síntomas de fusariosis y marchitez vascular, por su lado, en Colombia, Castellanos, *et al.* (2023) detectaron con pruebas de patogenicidad que *Fusarium oxysporum* fue el agente causal de marchitez vascular en parcelas plantadas de masaguaro

(*Pseudosamanea guachapele*) una leguminosa arbórea de importancia agrícola porque contribuye con la fijación biológica del nitrógeno.

En el año 2021, productores de la vereda Sabaneta municipio de Maripí en Colombia, debido a la gravedad y prevalencia de una enfermedad asociada a pudrición vascular en plantas de papayuela, enviaron muestras al laboratorio de sanidad vegetal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) regional Chiquinquirá, en donde se identificó a *Fusarium oxysporum* en las muestras analizadas, en consecuencia, el pasado 16 de agosto de 2022, la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Ambiental de Maripí (Boyacá) emitió comunicación oficial con este hallazgo a la Asociación Hortofrutícola de Colombia (Asohofrucol) (Anexo 1), en tal sentido, los resultados de este estudio muestran un progresivo avance de la enfermedad en todo el departamento de Boyacá, pues en los cuatro municipios que fueron muestreados, se aislaron 4 hongos los cuales fueron caracterizados preliminarmente con las claves detalladas dicotómicas o taxonómicas como *Fusarium* con características macroscópicas y microscópicas diferentes.

Con respecto a la actividad enzimática ligninolítica y celulolítica evaluada, se puede referenciar que, primero y según lo citado por Martínez, (2014), la pared celular de las plantas tiene como componente principal, hebras de polímeros de celulosa que rodean la célula vegetal, estas hebras están sostenidas por una matriz de hemicelulosa y lignina. Estos componentes están en concentraciones y proporciones diferentes en cada especie. La lignina proporciona soporte estructural, confiere rigidez, impermeabilidad y protección, pero existen microorganismos capaces de degradar la lignocelulosa mediante compuestos enzimáticos. Segundo, y conforme a lo mencionado por Agrios (2012), los microorganismos para desarrollarse y lograr su propagación, ejecutan modificaciones bioquímicas con enzimas que disgregan los elementos estructurales de las células de su hospedero para obtener sus nutrientes, que luego usarán como

energía para su metabolismo y formar estructuras, por tanto, en los laboratorios, la actividad y producción de estas enzimas microbianas es estudiada, identificada y evaluada para clasificarlos y seleccionarlos.

Por ejemplo, Rojas (2010) analizó la síntesis de enzimas ligninolíticas de hongos de pudrición blanca para su uso en procesos biotecnológicos, en otro estudio, Martínez (2014) evaluó la capacidad de degradación del complejo lignocelulósico que tiene algunos hongos filamentosos mediante sus sistemas enzimáticos extracelulares, determinando su capacidad de hidrolizar la celulosa y oxidar la lignina en medios de cultivo compuestos por carboximetilcelulosa y lignina, en este trabajo el género *Fusarium solani* fue referenciado con mayor potencial de degradación de la lignocelulosa entre el grupo de hongos evaluados, de igual manera Rojas (2010) cita que que *Fusarium proliferatum* tiene la capacidad de producir lactasa un enzima que degrada lignina.

En otra investigación, Bueno *et al.* (2009) evaluaron en medios de cultivo individuales la producción de enzimas extracelulares de aislamientos de *Fusarium solani* provenientes de plantas de maracuyá enfermas con pudrición del cuello. Ellos encontraron que el hongo tenía una mayor patogenicidad al tener una mayor producción de enzimas extracelulares como lacasas, amilasa, celulasa y proteasa, que degradaban activamente los componentes presentes en el tejido infectado de la maracuyá. Así mismo Patiño (2020) estimó la patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* en cultivos de Pasifloras concluyendo que la actividad enzimática, tiene al parecer, un vínculo muy cercano entre una alta producción de enzimas celulolíticas y ligninolíticas de los microorganismos fúngicos aislados y la mayor patogenicidad.

Otro punto importante en la implementación de las pruebas de actividad enzimática bacteriana, son los perfiles enzimáticos que se encuentran descritos en estudios científicos de bacterias fitopatógenas que causan marchitez vascular, aunque puede que no sea el principal

método de identificación si pueden contribuir a su selección. A este respecto, Rueda *et al.* (2014) refieren que *Ralstonia* sp., posee enzimas extracelulares como celulasas y pectinasas capaces de degradar las paredes de las células vegetales y causar degradación del xilema, así mismo, González *et al.* (2009) nombran que el microorganismo produce ligninas tipo lacasas. En otra investigación, Franco (2009) habla sobre las actividades enzimáticas implicadas en la patogenicidad y la virulencia de *Erwinia carotovora*, identificando a enzimas como celulasa, proteasa y pectinasa en condiciones *in vitro*. También, Toum (2015) relaciona que especies del género *Xanthomonas* sp., causantes de marchitez vascular, elaboran enzimas degradativas, que participan durante la infección como ligninasas, celulasas y pectinasas.

De modo que, en este estudio se determinó en medios de cultivo la actividad ligninolítica y celulolítica de bacterias y hongos para seleccionar los aislamientos por su capacidad enzimática. Por lo anterior, se puede inferir que los hongos aislados en los cuatro municipios de Boyacá pueden tener estos atributos de patogenicidad, como se evidenció con el análisis estadístico, principalmente en agar lignina, puesto que el crecimiento del hongo PCTD en este medio fue superior al control positivo que para este caso fue el hongo *Pleurotus ostreatus* e igual para PRaCH y cercano para PSoCH y PMaCH. Es probable que los hongos aunque tengan una velocidad diferente de crecimiento durante los 7 días evaluados, pueden tener un comportamiento patogénico acorde con los resultados obtenidos al que los autores citados anteriormente encontraron y es posible inferir que estos microorganismos sean causantes de marchitez vascular detectada en papayuela.

Para el caso de las bacterias seleccionadas PMaMT2, PMaDT2 y PCED en agar lignina y que presentaron a las 72 horas igual crecimiento que el control positivo, se podrían considerar para ser evaluadas dentro del grupo de bacterias que originan bacteriosis en papayuela o pueden

estar asociadas a un complejo bacteriano causante de enfermedad y merecen ser tenidos en cuenta estos rasgos de patogenicidad para ser analizados en las pruebas subsiguientes a este proyecto. Por otro lado, según estudios realizados por Puerto (2019) se puede reafirmar que para el caso de la evaluación de enzimas ligninolíticas, el salvado de trigo usado en el medio de cultivo permitió que crecieran los microorganismos capaces de utilizar la lignina presente en este sustrato como única fuente de carbono forzando a los diferentes aislamientos a tomar una vía metabólica adecuada para el uso del biopolímero para desarrollarse adecuadamente en el medio con este único componente.

Para el caso de la evaluación del agar celulosa, en los aislamientos realizados se evidenció crecimiento en el medio, sin embargo no se presentan halos de hidrólisis, lo que indica ausencia en la producción de enzimas celulolíticas. El crecimiento microbiano en los medios se debe posiblemente a la asimilación de algunos componentes presentes en este y que satisfacen los requerimientos nutricionales de los microorganismos estudiados. Por otro lado, el control positivo evidenció la producción de enzimas celulolíticas, las cuales se manifiestan por la formación de halos de hidrólisis alrededor de la colonia al aplicar el revelador. Teniendo en cuenta lo anterior se puede afirmar que estos aislamientos corresponden a microorganismos con una tasa de producción de enzimas celulolíticas nula.

En cuanto a la identificación de los tres aislamientos bacterianos seleccionados y que fueron referidos anteriormente, se puede considerar lo mencionado por Castillo y del Río (1997), donde indican que las bacterias que causan la marchitez vascular principalmente son bacilos Gram negativos de los géneros *Pseudomonas* y *Erwinia*, por otro lado y según Perea *et al.* (2011) y Muthoni *et al.* (2014), está *Ralstonia* sp., un bacilo Gram negativo causante de marchitez bacteriana en solanáceas. También Coutinho *et al.* (2021) indican que se puede encontrar a

*Pectobacterium bacteria*, bacilo Gram negativo causando pudriciones vasculares y pudriciones blandas en un amplio rango de cultivos agrícolas y plantas ornamentales. En esta investigación, los aislamientos preseleccionados fueron bacilos Gram negativos, sin embargo y de acuerdo las pruebas bioquímicas preliminares y la clasificación según Shaad y Kutsman, (2004), no se identificó a *Pseudomonas*, *Erwinia* o *Xanthomonas*, no obstante, existe la posibilidad que estén asociados a la pudrición vascular, lo cual implica que es necesario seguir evaluando el comportamiento y las características de estos aislamientos.

Es importante mencionar que este trabajo de investigación como opción de grado hace parte de un proyecto de mayor alcance y solamente está circunscrito a la colecta de las muestras biológicas para el aislamiento y caracterización preliminar de los microorganismos asociados a la pudrición vascular de la papayuela. En las fases posteriores del proyecto institucional se aborda con mayor detalle los aspectos de manejo agronómico y del componente ambiental que inciden en las condiciones del cultivo y del propio manejo de la enfermedad.

## Conclusiones

En el ejercicio de visita a campo se logró confirmar visualmente la presencia de pérdidas vegetales por pudrición, lo cual implica la presencia de un agente fitopatógeno que está causando la enfermedad. Los aislamientos realizados en los 4 municipios demuestran preliminarmente que 16 aislamientos bacterianos y 4 hongos pueden estar asociados al origen y el desarrollo de la pudrición vascular de la papayuela.

Los aislamientos bacterianos y fúngicos en las pruebas enzimáticas en medio ligninolítico evidenciaron diferentes niveles de actividad o producción de enzimas ligninolíticas, lo que puede implicar la posibilidad de que estos microorganismos están asociados como agentes causales de la enfermedad de marchitez vascular de la papayuela.

Los aislamientos bacterianos y fúngicos en las pruebas enzimáticas en medio celulolítico mostraron crecimiento en este medio pero no tienen actividad celulolítica al no observarse halos de hidrólisis alrededor del crecimiento microbiano.

Con las pruebas morfológicas y bioquímicas para los aislamientos bacterianos no se logró identificar ningún microorganismo relacionado con los fitopatógenos géneros causantes de marchitez vascular como son *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Erwinia*. No obstante existe la posibilidad que estén asociados a la pudrición vascular.

A partir de las pruebas morfológicas taxonómicas para aislamientos fúngicos se pudo caracterizar al género *Fusarium* en las muestras de los 4 municipios de Boyacá.

## Recomendaciones



Los diferentes comportamientos de los microorganismos en las pruebas bioquímicas y en los ensayos enzimáticos, no permitieron concluir con claridad que estos puedan ser o no agentes causales de marchitez vascular por tanto se requiere seguir realizando pruebas confirmatorias moleculares para identificarlos y estudios de mayor profundidad como ensayos de patogenicidad para poder determinar su condición fitopatógena en el cultivo de la papayuela.

Se recomienda efectuar pruebas de reacción de hipersensibilidad (RH) con los 16 aislamientos bacterianos y los 4 hongos aislados, por ser una respuesta rápida. Se podrían infiltrar suspensiones de estos microorganismos en diferentes tramos de hojas o tejidos de plantas indicadoras como pimentón o tabaco para infectar y luego observar necrosis a las 24 horas. Según Gómez *et al.* (2011) Esta reacción de hipersensibilidad (RH) es considerada una manifestación principal de resistencia de las plantas al ataque por patógenos y se evidencia por una muerte rápida de las células vegetales relacionada con la limitación del crecimiento del patógeno, que habitualmente se identifica con necrosis en el sitio de infección.

Se sugiere para futuros trabajos, además, realizar muestreos y análisis de microorganismos asociados a la rizósfera del cultivo afectado en los diferentes sitios de estudio.

## Anexos

### Anexo 1

 800 024 789-8	<b>ALCALDÍA MUNICIPAL DE MARIPI BOYACÁ</b> MODELO INTEGRADO DE PLANEACIÓN Y GESTIÓN – MIPG	 MARIPI AL COMPROMISO DE CORAZÓN	<b>FM-101</b>
	<b>OFICIO</b>		Versión: 1.0 Fecha: 01-04-2018 Página 1 de 2

Maripi 16 de Agosto de 2022

**DOCTORA:**  
**ELIANA LICET PEREZ PEREZ**  
**SECRETARIA DE AGRICULTURA**

Cordial saludo.

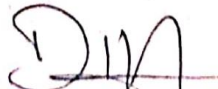
De manera atenta solicito los servicios de la Secretaria de Agricultura ya que en nuestro Municipio Maripi Boyacá occidente del Departamento, en la vereda de Sabaneta se registró un problema fitosanitario en el cultivo de papayuela.

El diagnóstico fue emitido por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA de Chiquinquirá donde mediante la toma de muestras se identificó el patógeno dando como resultado *Fusarium oxysporum*.

El avance de la situación es preocupante ya que muchas familias de esta vereda derivan su sustento de este producto. Solicitamos su colaboración con profesionales idóneos en el tema para generar un plan de acción en la vereda Sabaneta con los productores de papayuela para contrarrestar la problemática. Desde la Administración Municipal estamos atentos a colaborar en lo que requieran para hacer presencia en nuestro Municipio y la secretaria de Desarrollo Agropecuario y Ambiental estará a disposición de para reunir y capacitar a los productores afectados.

Hago llegar una cordial invitación para el día viernes 26 de Agosto a partir de las 9 am escuela vereda sabaneta donde además estamos haciendo extensiva a las diferentes Instituciones como Instituto Colombiano Agropecuario ICA, AGROSAVIA y ASOFRUCOL

Esperamos contar con su presencia como Institución.



**DIRCE GUERRERO CARO**  
SECRETARIA DESARROLLO AGROPECUARIO Y AMBIENTAL.  
CEL 3183374339

**“MARIPI UN COMPROMISO DE CORAZÓN”, 2020-2023** Palacio  
Municipal Centro Cra.5ª No. 3-30 Cel.: 312 529 8934 Telefax: 098 7265121  
Web: [www.Maripi-boyaca.gov.co](http://www.Maripi-boyaca.gov.co) e-mail: [goblemo@Maripi-boyaca.gov.co](mailto:goblemo@Maripi-boyaca.gov.co)



## **Anexo 2**

### **Pruebas bioquímicas**

- **Catalasa**

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua ( $H_2O$ ) y oxígeno ( $O_2$ ). El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa (Macfaddin, 2003).

#### ***Procedimiento***

Con una aguja de inoculación o con un palillo de madera, transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos.

Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas (liberación de gas).

#### ***Interpretación***

La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva.

Debido a que algunas bacterias poseen enzimas distintas de catalasa que pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, la observación de unas pocas burbujas pequeñas después de 20 a 30 segundos no se considera un resultado positivo.

- **Oxidasa**

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como último eslabón de la cadena de respiración aerobia, transfieren electrones (hidrógeno) al oxígeno y forman agua. El sistema citocromo se encuentra en microorganismos aerobios o microaerófilos y anaerobios

facultativos, de tal forma que la prueba de la oxidasa es importante para identificar microorganismos que carecen de la enzima o que son aerobios obligados.

Los diversos colorantes para la prueba de oxidasa son aceptores de electrones artificiales; el reactivo parafenilendiamina es incoloro en estado reducido, pero en presencia de citocromo oxidasa y el oxígeno atmosférico se oxida formando azul de indofenol, razón por la cual la reacción oxidasa positiva muestra un compuesto coloreado (Macfaddin, 2003).

### ***Interpretación***

Los microorganismos con el sistema citocromo oxidasa presentan una reacción positiva al contacto con el reactivo parafenilendiamina cambiando su estado incoloro a azul, morado o fuccia.

### Anexo 3

#### Medios sólidos para evaluación enzimática

##### 1. Medio Carboximetilcelulosa

<b>Formulación g/L</b>	
<b>Carboxihemicelulosa CMC</b>	<b>10g</b>
<b>Sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>0.5g</b>
<b>Cloruro de calcio CaCl<sub>2</sub></b>	<b>0.5g</b>
<b>Sulfato de magnesio MgSO<sub>4</sub></b>	<b>0.1g</b>
<b>Fosfato dibásico de potasio KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>0.1g</b>
<b>Agar</b>	<b>15g</b>

##### 2. Medio Lignina

<b>Formulación g/L</b>	
<b>Salvado de trigo</b>	<b>4g</b>
<b>Agar</b>	<b>15g</b>

## Anexo 4

### INFORME ESTADÍSTICO

A continuación, se describe el comportamiento del crecimiento de bacterias bajo la aplicación de diferentes tratamientos.

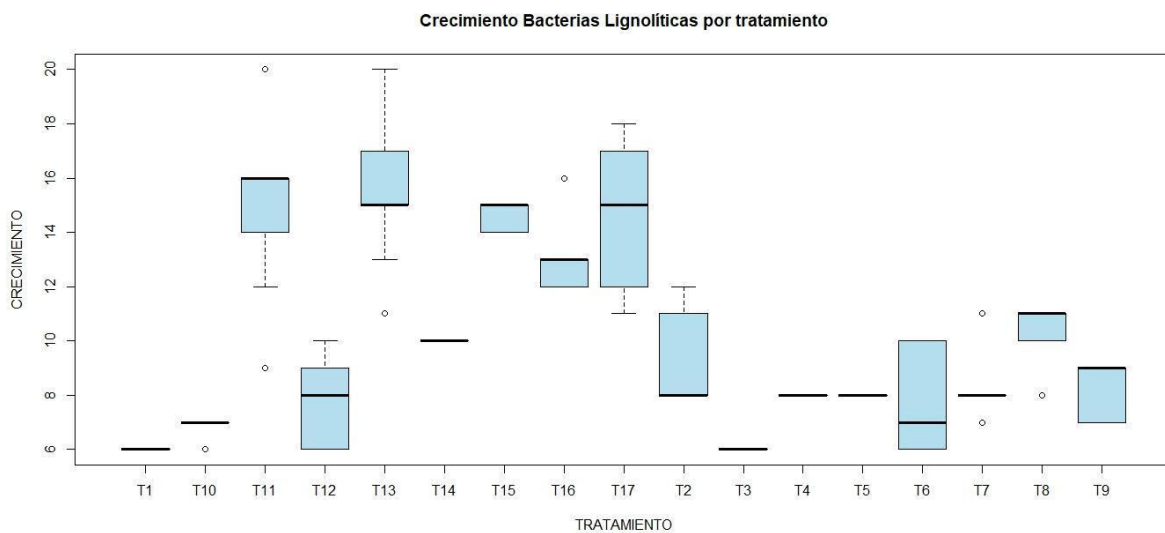
#### CRECIMIENTO BACTERIAS LIGNINOLÍTICAS.

Inicialmente se presentan algunas medidas descriptivas del crecimiento por tratamiento para las bacterias ligninolíticas.

	CRECIMIENTO	std r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
T1	6.000000	0.0000000	9	0.5444978	6	6	6	6
T10	6.888889	0.3333333	9	0.5444978	6	7	7	7
T11	15.222222	3.5276684	9	0.5444978	9	20	14	16
T12	7.888889	1.6158933	9	0.5444978	6	10	6	8
T13	15.888889	2.9767618	9	0.5444978	11	20	15	17
T14	10.000000	0.0000000	9	0.5444978	10	10	10	10
T15	14.666667	0.5000000	9	0.5444978	14	15	14	15
T16	13.333333	1.5811388	9	0.5444978	12	16	12	13
T17	14.666667	2.6457513	9	0.5444978	11	18	12	15
T2	9.222222	1.8559215	9	0.5444978	8	12	8	8
T3	6.000000	0.0000000	9	0.5444978	6	6	6	6
T4	8.000000	0.0000000	9	0.5444978	8	8	8	8
T5	8.000000	0.0000000	9	0.5444978	8	8	8	8

T6 7.666667 1.8027756 9 0.5444978 6 10 6 7 10  
T7 8.444444 1.5092309 9 0.5444978 7 11 8 8 8  
T8 10.111111 1.2692955 9 0.5444978 8 11 10 11 11  
T9 8.333333 1.0000000 9 0.5444978 7 9 7 9 9

Se puede apreciar que los tratamientos 13, 11, 15 y 17 presentan los mayores promedios en cuanto al crecimiento de las bacterias, junto con la mayor variabilidad entre las réplicas, en la siguiente grafica se puede apreciar lo mencionado anteriormente.



Los resultados anteriores muestran que los promedios del crecimiento ... presentan diferencias, sin embargo, más adelante se verificara si estas diferencias son significativas o no, se prueba la normalidad en la variable respuesta (crecimiento), encontrando que esta variable no sigue una distribución normal, a continuación, los resultados de la prueba.

Shapiro-Wilk normality test

data: CRECIMIENTO

W = 0.88822, p-value = 0.000000002307

Este supuesto básico para el análisis de varianza no se cumple, sin embargo, se procede a realizarlo, a fin de identificar si las diferencias entre los promedios de los tratamientos son significativas o no, se prueba el siguiente sistema de hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \dots = \mu_k, \quad k = 1,2,3$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j, \quad \text{para algún par } (i, j)$$

El anterior sistema de hipótesis se prueba con un análisis de varianza, los resultados se muestran a continuación:

Tabla de Análisis de varianza

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TRATAMIENTO	16	1638.1	102.38	38.37	<2e-16 ***
Residuals	136	362.9	2.67		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En los resultados obtenidos en el análisis de varianza se rechaza la hipótesis nula, es decir, el crecimiento promedio entre los tratamientos difiere significativamente en al menos un par de promedios de los sistemas (p-valor inferior al 5%), a fin de identificar la procedencia de estas diferencias se plantea la prueba de Duncan, la cual está encaminada a determinar que parejas de medias difieren significativamente, los resultados se presentan a continuación:

Means with the same letter are not significantly different.

CRECIMIENTO groups

T13	15.888889	a
T11	15.222222	a
T15	14.666667	ab
T17	14.666667	ab
T16	13.333333	b
T8	10.111111	c
T14	10.000000	cd
T2	9.222222	cde
T7	8.444444	def
T9	8.333333	ef
T4	8.000000	ef
T5	8.000000	ef
T12	7.888889	ef
T6	7.666667	ef
T10	6.888889	fg
T1	6.000000	g
T3	6.000000	g

De acuerdo a la prueba anterior se identifica que los crecimientos de los tratamientos 13 y 11 difieren significativamente de los demás tratamientos y son superiores, ...

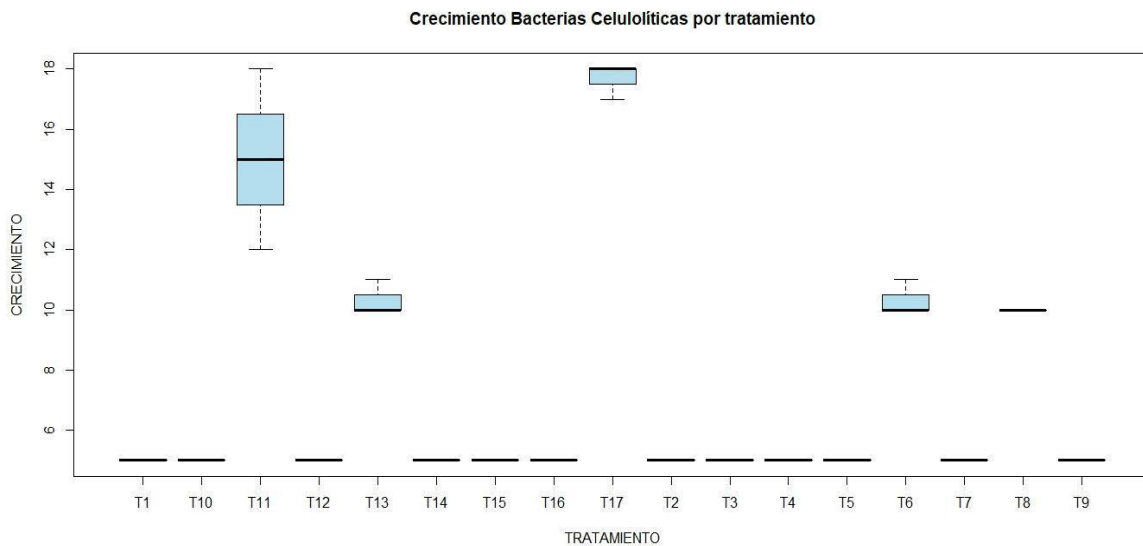
## CRECIMIENTO BACTERIAS CELULOLÍTICAS.

Inicialmente se presentan algunas medidas descriptivas del crecimiento por tratamiento para las bacterias celulolíticas.

	CRECIMIENTO	std	r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
T1	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T10	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T11	15.00000	3.0000000	3	0.4428074	12	18	13.5	15	16.5
T12	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T13	10.33333	0.5773503	3	0.4428074	10	11	10.0	10	10.5
T14	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T15	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T16	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T17	17.66667	0.5773503	3	0.4428074	17	18	17.5	18	18.0
T2	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T3	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T4	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T5	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T6	10.33333	0.5773503	3	0.4428074	10	11	10.0	10	10.5
T7	5.00000	0.0000000	3	0.4428074	5	5	5.0	5	5.0
T8	10.00000	0.0000000	3	0.4428074	10	10	10.0	10	10.0

T9 5.00000 0.0000000 3 0.4428074 5 5 5.0 5 5.0

Se puede apreciar que los tratamientos 17, 11, 13, 6 Y 8 presentan los mayores promedios en cuanto al crecimiento de las bacterias, junto con la mayor variabilidad entre las réplicas, los demás tratamientos tienen un comportamiento constante en las mediciones de las réplicas, en la siguiente grafica se puede apreciar lo mencionado anteriormente.



Los resultados anteriores muestran que los promedios del crecimiento ... presentan diferencias, sin embargo, más adelante se verificara si estas diferencias son significativas o no, se prueba la normalidad en la variable respuesta (crecimiento), encontrando que esta variable no sigue una distribución normal, a continuación, los resultados de la prueba.

Shapiro-Wilk normality test

data: CRECIMIENTO

W = 0.61952, p-value = 2.97e-10

Este supuesto básico para el análisis de varianza no se cumple, especialmente por las mediciones constantes en el crecimiento de las bacterias en la mayoría de los tratamientos, sin embargo, se procede a realizar el análisis de varianza, a fin de identificar si las diferencias entre los promedios de los tratamientos son significativas o no, se prueba el siguiente sistema de hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \dots = \mu_k, \quad k = 1,2,3$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j, \quad \text{para algún par } (i,j)$$

El anterior sistema de hipótesis se prueba con un análisis de varianza, los resultados se muestran a continuación:

Tabla de Análisis de varianza

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TRATAMIENTO	16	767.7	47.98	81.57	<2e-16 ***
Residuals	34	20.0	0.59		
---					
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

En los resultados obtenidos en el análisis de varianza se rechaza la hipótesis nula, es decir, el crecimiento promedio entre los tratamientos difiere significativamente en al menos un par de promedios de los sistemas (p-valor inferior al 5%), a fin de identificar la procedencia de estas diferencias se plantea la prueba de Duncan, la cual está encaminada a determinar que parejas de medias difieren significativamente, los resultados se presentan a continuación:

Means with the same letter are not significantly different.

CRECIMIENTO groups

T17	17.66667	a
T11	15.00000	b
T13	10.33333	c
T6	10.33333	c
T8	10.00000	c
T1	5.00000	d
T10	5.00000	d
T12	5.00000	d
T14	5.00000	d
T15	5.00000	d
T16	5.00000	d
T2	5.00000	d
T3	5.00000	d
T4	5.00000	d
T5	5.00000	d
T7	5.00000	d
T9	5.00000	d

De acuerdo a la prueba anterior se identifica que el crecimiento de las bacterias celulolíticas en el tratamiento 17 es significativamente superior al crecimiento de los demás tratamientos, de acuerdo con la prueba de Duncan se identifican 4 grupos de tratamientos que generan resultados similares (no muestran diferencias significativas).

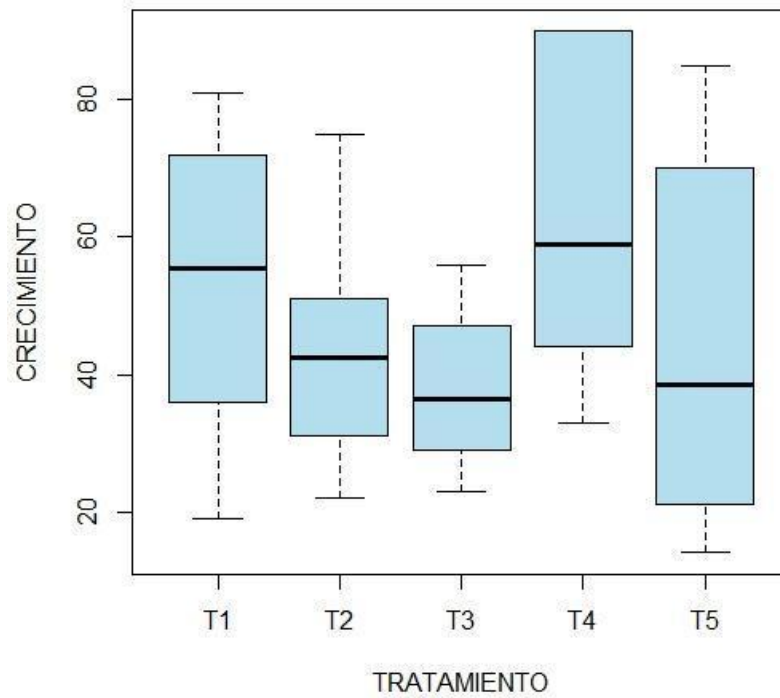
## CRECIMIENTO HONGOS LIGNINOLÍTICA.

Inicialmente se presentan algunas medidas descriptivas del crecimiento por tratamiento para los hongos ligninolíticos.

CRECIMIENTO	std	r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75	
T1	53.16667	21.75600	18	4.786445	19	81	36.25	55.5	72.00
T2	44.05556	17.41018	18	4.786445	22	75	31.25	42.5	50.75
T3	38.05556	11.30576	18	4.786445	23	56	29.00	36.5	47.00
T4	62.66667	22.00535	18	4.786445	33	90	44.25	59.0	90.00
T5	44.33333	25.95018	18	4.786445	14	85	21.00	38.5	69.50

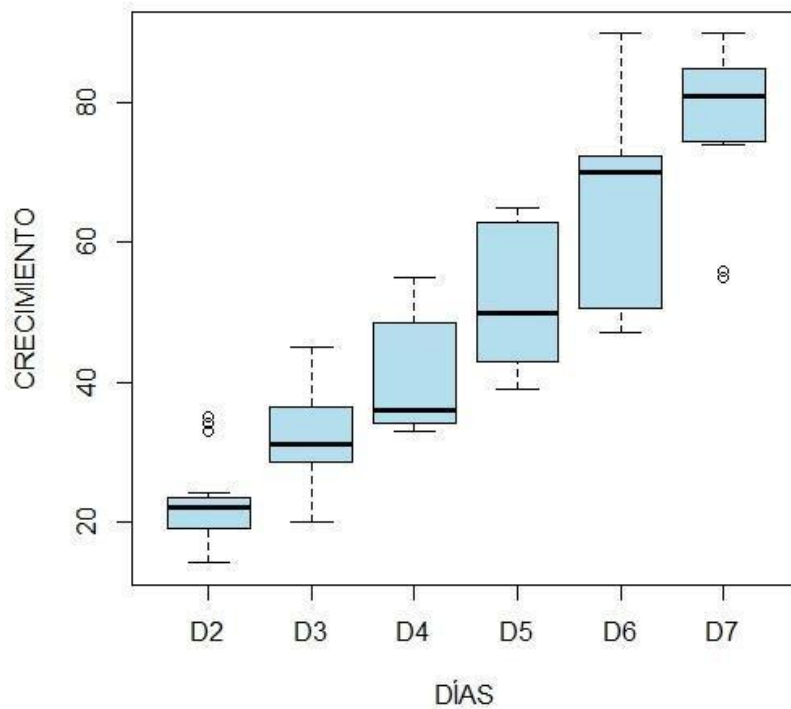
Se puede apreciar que los tratamientos 4 y 1 presentan los mayores promedios en cuanto al crecimiento de los hongos, el tratamiento 5 presenta la mayor variabilidad entre las mediciones de las réplicas, en la siguiente grafica se puede apreciar lo mencionado anteriormente.

### Crecimiento Hongos Lignolítica por tratamiento



Los resultados anteriores muestran que los promedios del crecimiento ... presentan diferencias, sin embargo, más adelante se verificara si estas diferencias son significativas o no. Adicionalmente se presenta la evolución del crecimiento en el tiempo (días de medición a los 2, 3, 4, 5, 6 y 7).

**Crecimiento Hongos Lignolítica por días**



Como se aprecia en la gráfica anterior al día 2 el crecimiento de los hongos es similar en los 5 tratamientos (baja variabilidad), mientras que la mayor variabilidad en las mediciones se presenta al día 6, también se identifican unos crecimientos fuera de lo normal al día 7 (mediciones bajas en el tratamiento 3). Se prueba la normalidad en la variable respuesta (crecimiento), encontrando que esta variable no sigue una distribución normal, a continuación, los resultados de la prueba.

Shapiro-Wilk normality test

data: CRECIMIENTO

W = 0.94578, p-value = 0.0009276

Este supuesto básico para el análisis de varianza no se cumple, sin embargo, se procede a realizar el análisis de varianza, a fin de identificar si las diferencias entre los promedios de los tratamientos son significativas o no, se prueba el siguiente sistema de hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \dots = \mu_k, \quad k = 1,2,3$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j, \quad \text{para algún par } (i, j)$$

El anterior sistema de hipótesis se prueba con un análisis de varianza, los resultados se muestran a continuación:

Tabla de Análisis de varianza

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TRATAMIENTO	4	6636	1659.0	4.023	0.0049 **
Residuals	85	35052	412.4		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En los resultados obtenidos en el análisis de varianza se rechaza la hipótesis nula, es decir, el crecimiento promedio entre los tratamientos difiere significativamente en al menos un par de promedios de los sistemas (p-valor inferior al 5%), a fin de identificar la procedencia de estas diferencias se plantea la prueba de Duncan, la cual está encaminada a determinar que parejas de medias difieren significativamente, los resultados se presentan a continuación:

CRECIMIENTO groups		
T4	62.66667	a
T1	53.16667	ab

T5 44.33333 bc  
 T2 44.05556 bc  
 T3 38.05556 c

De acuerdo a la prueba anterior se identifica que el crecimiento de hongos lingolíticas en el tratamiento 4 es significativamente superior al crecimiento de los tratamientos 2,3 y 5, pero no difiere significativamente del 1.

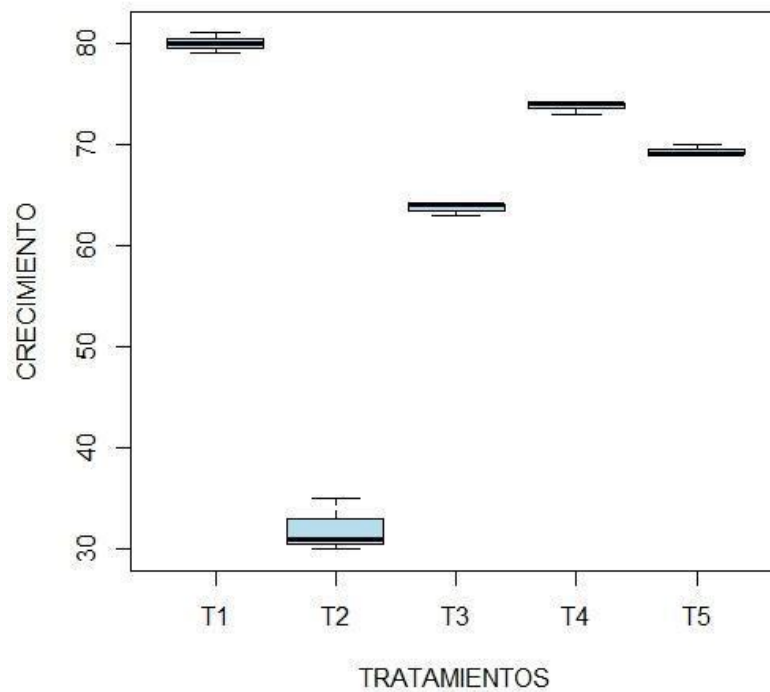
### **CRECIMIENTO HONGOS CELULOLÍTICAS.**

Inicialmente se presentan algunas medidas descriptivas del crecimiento por tratamiento para los hongos celulolítica.

CRECIMIENTO	std	r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75	
T1	80.00000	1.0000000	3	0.7745967	79	81	79.5	80	80.5
T2	32.00000	2.6457513	3	0.7745967	30	35	30.5	31	33.0
T3	63.66667	0.5773503	3	0.7745967	63	64	63.5	64	64.0
T4	73.66667	0.5773503	3	0.7745967	73	74	73.5	74	74.0
T5	69.33333	0.5773503	3	0.7745967	69	70	69.0	69	69.5

Se puede apreciar que el tratamiento 1 y 4 presentan los mayores promedios en cuanto al crecimiento de las bacterias, la variabilidad entre las réplicas es similar en los tratamientos 3, 4 y 5, en la siguiente grafica se puede apreciar lo mencionado anteriormente.

### Crecimiento Hongos Celulolítica por tratamiento



Los resultados anteriores muestran que los promedios del crecimiento ... presentan diferencias, sin embargo, más adelante se verificara si estas diferencias son significativas o no, se prueba la normalidad en la variable respuesta (crecimiento), encontrando que esta variable no sigue una distribución normal, a continuación, los resultados de la prueba.

Shapiro-Wilk normality test

data: CRECIMIENTO

W = 0.78814, p-value = 0.0026

Este supuesto básico para el análisis de varianza no se cumple, sin embargo, se procede a realizar el análisis de varianza, a fin de identificar si las diferencias entre los promedios de los tratamientos son significativas o no, se prueba el siguiente sistema de hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \dots = \mu_k, \quad k = 1,2,3$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j, \quad \text{para algún par } (i, j)$$

El anterior sistema de hipótesis se prueba con un análisis de varianza, los resultados se muestran a continuación:

Tabla de Análisis de varianza

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TRATAMIENTOS	4	4205	1051.2	584	8.41e-12 ***
Residuals	10	18	1.8		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En los resultados obtenidos en el análisis de varianza se rechaza la hipótesis nula, es decir, el crecimiento promedio entre los tratamientos difiere significativamente en al menos un par de promedios de los sistemas (p-valor inferior al 5%), a fin de identificar la procedencia de estas diferencias se plantea la prueba de Duncan, la cual está encaminada a determinar que parejas de medias difieren significativamente, los resultados se presentan a continuación:

Means with the same letter are not significantly different.

### CRECIMIENTO groups

T1	80.00000	a
T4	73.66667	b
T5	69.33333	c
T3	63.66667	d
T2	32.00000	e

De acuerdo a la prueba anterior se identifica que el crecimiento de los hongos es significativamente diferentes en cada uno de los tratamientos, siendo el tratamiento 1 superior a los demás y el tratamiento 2 tiene mediciones del crecimiento de hongos inferior a los demás tratamientos.

## Bibliografía

- Acevedo, Á., y Jiménez, N. (comps). (2019). Agroecología. Experiencias comunitarias para la agricultura familiar en Colombia. Bogotá: Corporación Universitaria Minuto de Dios - Uniminuto; Editorial Universidad del Rosario. Doi: [doi.org/10.12804/tp9789587842326](https://doi.org/10.12804/tp9789587842326)
- Agrios, G. (2012). *Plant pathology*. Tercera edición. Academic Press INC. Elsevier Science.
- Red de información y comunicación del Sector Agropecuario (AGRONET). Recuperado de: <https://www.agronet.gov.co/Paginas/inicio.aspx>
- Benítez S., Lobo M., Arturo O. y Medina C. (2013). Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Vasconcellea goudotiana*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 14(2):187-197. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449944862002>
- Bernal, R., Gradstein, S., & Celis, M. (2019). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co>
- Barnett, L.H. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp 218
- Bravo, S., Larriva, W. y Minchala, L. (2012). Boletín Técnico no. 409. Manejo integrado de la marchitez vascular o fusariosis (*Fusarium oxysporum*) en el cultivo de Babaco. Cuenca, Ecuador: INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuaria, Estación Experimental del Austro en Cuenca Ecuador). <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2327/1/BT409.pdf>

- Bueno, C., Fisher, I., Días, D. y Furtado, E. (2009). Producción de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. *Tropical Plant Pathology*, vol. 34 (5) 343-346. <https://www.scielo.br/j/tpp/a/VM5cv8bhTCYtngR8JMxLzbK/?lang=pt>
- Castaño, J. y Del Río, L. (1 Edición). Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Centro editorial Universidad de Caldas. Zamorano acadmic press. Escuela agrícola Panamericana. Honduras. 1997.
- Carrasco B., García R., Díaz C., Avila P., Cáceres P., Lobos G., Silva H., y Caligari P. (2014). Genetic and morphological characterization of the endangered Austral papaya *Vasconcellea chilensis* (Planch. ex A. DC.) Solms. *Genet Resour Crop Evol.* 61:1423–1432. <https://link-springer-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/content/pdf/10.1007%2Fs10722-014-0143-0.pdf>
- Castellanos, L., Monroy, H. y Rivera, X. (2023). Wilting by *Fusarium oxysporum* Schlthl in masaguaro (*Pseudosamanea guachapele*) (Kunth). *INGE CUC*, vol. 19 no. 1, pp. 11–21 <http://doi.org/10.17981/ingecuc.19.1.2023.02>
- Castro, W., Carrera, K. y Herrera, L. (2019). Incidence of wilt disease in *Solanum quitoense* at the amazonic region of Pastaza, Ecuador. *CAGRICOLA*. Vol.46, No.1, 13-17.
- Corzo, M. y Quiñones. M. (2017). Identificación bioquímica, fisiológica y patogénica de aislados bacterianos asociados a la pudrición blanda y pierna negra en papa. *Protección Vegetal*. Vol. 32, No. 3. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v32n3/rpv05317.pdf>
- Countinho, T., Yoon, G., y Van der Waals, J. (2021) *Pectobacterium*. *ResearchGate*. *Bergey's Manual of systematics Archea and bacteria*. <https://www.reaserchgate.net/publication/356764843>

- Gómez, S., y Zavaleta, E. (2011). Respuesta de Hipersensibilidad, una Muerte Celular Programada para Defenderse del Ataque por Fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2), 154-164.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092011000200007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000200007&lng=es&tlng=es).
- Guerrero, M., Gomez, R., y Bermudez, I. (2016). Obtención de plantas madres de *Vasconcellea x helbonii* (Badillo) Badillo a partir de estacas en condiciones semicontroladas. *Biotecnología vegetal*. Vol 16 n°1: 13-20.  
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/505/pdf>
- David S., Osorio K., Lagos T. (2011). Evaluation of growth and the floral morphology And the fruit of chilacuán (*Vasconcellea cundinamarcensis* B.) *Revista de ciencias agrícolas*. 28(1): 9 – 23.  
<https://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/28/36>
- Di Pietro, A., García-Maceira, F.I., Méglecz, E. and Roncero, M.I.G. (2001), A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39: 1140-1152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02307.x>  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2001.02307.x>
- Espinosa I. (2016). Germinación, microinjertación y cultivo de callos *in vitro* de *Vasconcellea stipulata* V.M. Badillo y *Vasconcellea pubescens* A.DC. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional De La Plata. Facultad De Ciencias Exactas. Departamento De Ciencias Biológicas. La Plata - Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/53339>
- Faria M., Ferreira T. & Weingart R. (2020). Fungal diseases of non-conventional food plants: first

report of *Stagonosporopsis caricae* causing leaf spots on *Vasconcellea monoica*. *Australasian Plant Disease. Notes* 15: 20.<https://link.springer.com/article/10.1007/s13314-020-00391-y>

Fonseca, J. (2020). Evaluación de la eficiencia de la endoterapia para control de enfermedades vasculares en el cultivo de papayuela (*Vasconcellea cundinamarcensis*) en Boyacá. *II Congreso Internacional de Ciencias Agrarias y Ambientales*, Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD, Noviembre 5 - 7, Bogotá, Colombia, pp. 78 – 83.

Ferreira, A., González, J., Garcia, H. *et al.* and Freitas, E. (2019). Evaluation of antitumor and cytotoxic activity in vitro of latex *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. (Caricaceae). *South African Journal of Botany* 127, pp 308–312.<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.09.011>

Folharini, Z., et al. and Freitas, E. (2019). Nutritional characterization of *Vasconcellea quercifolia* A.St-Hil.: potential for the development of functional food. *Food Science and Technology*. Campinas, 39(Suppl. 2): 432-438.<https://doi.org/10.1590/fst.18018>

Fuertes, C. (2019). Diversidad, Distribución y Uso del Genero *Vasconcellea* (Caricaceae) en el Sur de los Andes Colombianos (Tesis pregrado). Programa de Ingeniería Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca.

<http://repositorio.unicauca.edu.co:8080/bitstream/handle/123456789/1622/DIVERSIDAD%2C%20DISTRIBUCI%C3%93N%20Y%20USO%20DEL%20G%C3%89NERO%20VASCONECELLEA%20%28CARICACEAE%29%20EN%20EL%20SUR%20DE%20LOS%20ANDES%20COLOMBIANOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Franco, Y. (2009). Determinación de actividades enzimáticas implicadas en la patogenicidad y la virulencia de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *Erwinia chrysanthemi*. *Fitosanidad*.

Volumen 13 Issue 1 pp. 47-48.

<https://agris.fao.org/search/en/providers/122597/records/64724a1c2c1d629bc979d078>

Da Silva, F., et al. and Freitas, E. (2022). Nutritional potential of *Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. green fruit flour. *Braz. J. Food Technol., Campinas*, v. 25, e2021080  
<https://doi.org/10.1590/1981-6723.08021>

Dean, R., Van-Kan, J., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., Di-Pietro, A., Spanu, P.,

Rudd, J., Dickman, M. Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13 (4): 414-430.  
<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

Gobernación de Boyacá (29 de noviembre de 2023). Planes y esquemas de ordenamiento territorial de Boyacá. <https://ordenamiento.boyaca.gov.co/planes-y-esquemas-de-ordenamiento-territorial/>

González, I., Arias, Y. y Peteira, B. (2009). Interacción Planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *Ralstonia solanacearum* - plantas hospedantes. *Revista de Protección Vegetal*, 24(2), 69-80. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000200001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000200001&lng=es&tlng=es)

Gutiérrez, A., Nolasco, O. y Santa, C. (2017). Purificación y caracterización preliminar de proteasas del látex de *Vasconcellea candicans* (A. Gray) A. DC (Mito). *Scientia Agropecuaria* 8 (1): 7– 17. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2017.01.01

Illescas, M. (2022). Evaluación Del Potencial Nutracéutico Y Antibacteriano Del Extracto De Semillas De Papaya Andina (*Vasconcellea pubescens* A. DC.) Frente A *Salmonella*

*enteritidis* Y *Escherichia coli*. (Tesis de pregrado, Universidad Científica del Sur)  
Repositorio.<https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/2672/TL-Illescas%20M-Ext.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Kutsmann, J. (2004). Determinación de especies de *Erwinia carotovora* (Dye) Hall como agentes causales de “pudrición blanda en cala” (*Zantedechia* spp.). (Tesis pregrado). Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía. Universidad Austral de Chile. Valdivia Chile.  
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fak.96d/pdf/fak.96d.pdf>

Leslie J. and Summerell B. (2006). The Fusarium Laboratory Manual. Illustrated by Suzanne Bullock. Publishing Blackwell. Blackwell Publishing Professional. New York: E.E.U.U.

López M., Murillo, J. y Palacio-Bielsa, A. (2018). Enfermedades de plantas causadas por bacterias. Bubok Publishing S.L. <https://elibro-net.bibliotecavirtual.unad.edu.co/es/ereader/unad/118649?page=153>

Latorre B. (7.ª edición). Compendio de las enfermedades de las plantas. Ediciones UC. American Psychological Assoc 2018. <https://search-ebshost-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=2225751&lang=es&site=ehost-live>

Lemos, F., Villalba, M., Tagliati, C. Cardoso, V., Salas C., Lopesa M. (2016). Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity of a *Vasconcellea cundinamarcensis* proteinase fraction with pharmacological activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26 pp 94–101.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.008>

Martínez, Y. (2014). Selección De Hongos Filamentosos Con Potencial Para La Degradación De Lignocelulosa Aislados De Desechos Agroindustriales De Café E Higuierilla. (Tesis

pregrado). Universidad Católica De Manizales. Facultad De Ciencias De La Salud.  
Programa De Bacteriología. Manizales  
<https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/987/1/Manuela%20Martinez%20Restrepo.pdf>

Maselli A, Rosales L., Guevara Y. & Suárez Z. (2010). Reaction of the genera *Carica* AND *Vasconcellea* materials to *Erwinia papayae*, *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Protección Vegetal*. 25(3), 157-165.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522010000300003&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522010000300003&script=sci_arttext&tlng=en)

Macfaddin J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Argentina: Editorial panamericana p. 849-682.

Muthoni, J., Shimelis, H., Melis, R. (2014) *et al.* Response of Potato Genotypes to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia Solanacearum* (Smith)(Yabuuchi et al.) In the Tropical Highlands. *Am. J. Potato Res.* 91, 215–232. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12230-013-9340-1>

Nelson PE, Toussoun TA and Marasas W (1983) *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. Press, University Park, The Pennsylvania State University. EE. UU.

Ochoa. J., Fonseca. G. and Ellis, M. (2000). First Report of Fusarium Wilt of Babaco (*Carica × heilbornii* var. *pentagona*) in Ecuador. *Plan disease*. 84:199.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.199A>

Oliveira, R., et al and...Da Silva, F. (2020). The proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* accelerates wound healing after corneal chemical burn in rabbits. *BURNS* 46 pp 928-936. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.10.005>

- Patiño M. (2020). Evaluación de la resistencia de introducciones de *Passifloras* spp. a la “secadera” causada por *Fusarium* spp. de zonas productoras. (Tesis Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Posgrados. Bogotá, Cundinamarca - Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78567>
- Perea, J., García,R., Allende, R. ... y Sary, F. (2011) Identification of Races and Biovars of Isolated From Tomato Plants. *Am. J. Potato Res.* 91:215–23. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n2/v29n2a2.pdf>
- Plants of the World Online (2013). Published on the Internet <https://powo.science.kew.org/> (acceso 14 de marzo de 2023).
- Puerto, W. (2019). Desarrollo de un Medio de Cultivo de Origen Natural para el Crecimiento de Microorganismos con capacidad Lignolítica. (Tesis Pregrado). Facultad de Ciencia de la Salud. Universidad Colegio mayor de Cundinamarca. Bogotá Colombia. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3708/Informe%20final%20Wilson%20Alejandro%20Puerto%20Zea.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Robles A., Gómez R., Macas F., A. y Torres R. (2014) Estudio De La Patogenicidad De Aislados De *Fusarium* Spp., Asociados A La Marchitez Vascular Del Babaco En Loja- Ecuador. *Centro de Biotecnología*, Vol. 3 Nro. 1. PP 61-72 [https://www.researchgate.net/publication/279941150\\_Estudio\\_de\\_la\\_patogenicidad\\_de\\_aislados\\_de\\_Fusarium\\_spp\\_asociados\\_a\\_la\\_marchitez\\_vascular\\_del\\_Babaco\\_en\\_Loja-Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/279941150_Estudio_de_la_patogenicidad_de_aislados_de_Fusarium_spp_asociados_a_la_marchitez_vascular_del_Babaco_en_Loja-Ecuador)
- Robles A., Herrera L. y Torres R. (2016) Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona* Badillo) Principales agentes fitopatógenos y estrategias de control. Major plant pathogens and control strategies. *Centro Agrícola*. 43 (2): 83-92. <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v43n2/cag11216.pdf>

Robles, A. (2017). Etiología de la Marchitez Vascular del Babaco (*vasconcellea heilbornii* var. pentagona Badillo) y control biológico en el sur de Ecuador. (Tesis doctoral ciencias agrícolas). Universidad Central Marta Abreu de las Villas. Universidad Nacional de Loja. Santa Clara - Cuba.

<https://elibro-net.bibliotecavirtual.unad.edu.co/es/ereader/unad/91308>

Rojas, G. (2010). Producción De Enzimas Lignolíticas Por Hongos De Pudrición Blanca Aislados En Nuevo León. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma De Nuevo León Facultad De Ciencias Biológicas. México. <https://eprints.uanl.mx/2244/1/1080190928.pdf>

Rueda Puentes y col. (2014). *Ralstonia solanacearum*: Una Enfermedad Bacteriana de Importancia Cuarentenaria en el Cultivo de *Solanum tuberosum* L. *Invurnos*. Vol. 9 No. 1: 24-36 [https://www.researchgate.net/profile/Edgar-Rueda-Puentes/publication/264701986\\_Ralstonia\\_solanacearum\\_Una\\_enfermedad\\_bacteriana\\_de\\_importancia\\_cuarentenaria\\_en\\_el\\_cultivo\\_de\\_Solanum\\_tuberosum\\_L/links/5ded9892299bf10bc34c56c1/Ralstonia-solanacearum-Una-enfermedad-bacteriana-de-importancia-cuarentenaria-en-el-cultivo-de-Solanum-tuberosum-L.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Edgar-Rueda-Puentes/publication/264701986_Ralstonia_solanacearum_Una_enfermedad_bacteriana_de_importancia_cuarentenaria_en_el_cultivo_de_Solanum_tuberosum_L/links/5ded9892299bf10bc34c56c1/Ralstonia-solanacearum-Una-enfermedad-bacteriana-de-importancia-cuarentenaria-en-el-cultivo-de-Solanum-tuberosum-L.pdf)

Schaad, N., Jones, J. and Chun, W. (3 Ed.) (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota, U.S: The American Phytopathological Society.

Scheldeman X., Willemens E., Coppens d'Eeckenbrugge E., Romeijn-Peeters E. Restrepo E. ... y Van Damme P. (2007). Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. *Biodivers Conserv.* 16 pp 1867–1884.

<https://link-springer-com.bibliotecavirtual.unad.edu.co/content/pdf/10.1007%2Fs10531-006-9086-x.pdf>

WeatherSpark.com and Cedar Lake Ventures, Inc. El Clima. Recuperado el 15 de noviembre de 2023. <https://es.weatherspark.com/y/24294/Clima-promedio-en-Combita-Colombia-durante-todo-el-a%C3%B1o>

Torres, M., Vega, A., Salas, C., Rubioe, J., Silva, E. and Castillo, L. (2019). Antifungal activity of proteolytic fraction (P1G10) from (*Vasconcellea cundinamarcensis*) latex inhibit cell growth and cell wall integrity in *Botrytis cinérea*. International Journal of Food Microbiology. 289 pp 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.027>

Tovar J. (2019). Evaluación exploratoria de la germinación in vitro de semillas de dos especies de importancia ecosistémica mediante diferentes métodos de escarificación en Tunja (Boyacá). (Tesis pregrado). Universidad Nacional abierta y a Distancia. Facultad de ingeniería Agroforestal. ECAMPMA. Tunja, Boyacá-Colombia. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25570/%20%09jrtovarn.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (acceso 18 de octubre 2021).

Toum, L. (2015). Mecanismos de *Xanthomonas campestris pv. campestris* en la supresión de la respuesta inmune de *Arabidopsis thaliana*. (Tesis doctoral) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5889\\_ToumTerrones.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5889_ToumTerrones.pdf)

