

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS QUE AFECTAN AL MARACUYA (*Passiflora edulis* Sims) Y OTRAS PASIFLORAS EN COLOMBIA*

Francisco Morales¹, Iván Lozano¹, Claritza Muñoz¹, Mauricio Castaño¹, José Arroyave¹, Francia Varón², Bibiana Chávez³, Gloria Castillo³

¹ Unidad de Virología, CIAT, AA 6713 Cali, Colombia; ² ICA; ³ CORPOICA, Palmira, Colombia. Correo f.morales@cgiar.org.

*Investigación cofinanciada por COLCIENCIAS

RESUMEN

Se visitaron 11 departamentos productores de maracuyá (*Passiflora edulis*) en Colombia, donde se colectaron 338 muestras de plantas del frutal aparentemente afectadas por enfermedades virales. El análisis de estas muestras se realizó mediante técnicas de patogenicidad, microscopía electrónica, serología con anticuerpos monoclonales y policlonales, amplificación de ADNc, clonación, hibridación y secuenciación de ácidos nucleicos. Se detectaron dos virus, siendo el más prevalente (incidencia > 95%) un potyvirus transmitido por áfidos. Un aislamiento de este potyvirus procedente de Roldanillo, Valle, se amplificó mediante la técnica molecular de RT-PCR, se clonó y secuenció, estableciéndose una relación de identidad superior al 97% con aislamientos del *Virus del mosaico de la soya* (SMV). Este virus causa también la enfermedad de 'la hoja morada' de la granadilla (*Passiflora ligularis*) e infecta *P. quadrangularis* (badea), *P. adenopoda*, *P. caerulea*, y *P. pinnatistipula* (chulupa). El segundo virus detectado en los departamentos del Valle, Antioquia y Santander, se identificó como una especie del género *Tymovirus*. Este virus es diferente a otros tymovirus caracterizados a nivel molecular (60-76% de identidad en la secuencia del genoma parcial secuenciado), pero mostró ser patogénica y antigenicamente similar al *Virus del mosaico amarillo del maracuyá* descrito en Brasil. Por consiguiente, se conserva este nombre para el tymovirus colombiano mientras se caracteriza un aislamiento brasileño a nivel molecular. El tymovirus también infectó *P. adenopoda*, *P. pinnatistipula*, and *P. quadrangularis*. La producción de material reproductivo de maracuyá, granadilla, badea y otras pasifloras libre de virus, coincide con un interés creciente por fomentar el cultivo y así suplir la creciente demanda interna y externa de pasifloras en Colombia.

Palabras clave : Frutales, pasifloras, enfermedades virales

SUMMARY

The main passionfruit production areas in 11 departments of Colombia, were surveyed and a total of 338 samples collected from diseased passionfruit plants. Samples were examined by electron microscopy, serology, ADNc amplification, cloning and sequencing of viral nucleic acids. The survey and analyses conducted, demonstrated the existence of two different viruses. The prevalent viral pathogen in all departments surveyed, was a species of the *Potyvirus* genus. An isolate of this potyvirus from Roldanillo, Valle, was cloned and partially sequenced, demonstrating a high nucleotide sequence identity (97%) with *Soybean mosaic virus* (SMV). The second virus, detected only in the departments of Valle, Antioquia and Santander, was shown to be a distinct species of the *Tymovirus* genus (60-76% homology with tymoviruses characterized at the molecular level). However, this virus was antigenically related to *Passion fruit yellow mosaic virus*, a tymovirus that induces similar symptoms in passionfruit in Brazil. Consequently, this name will be retained for the Colombian tymovirus until an isolate of the Brazilian tymovirus is characterized at the molecular level. The possibility of producing virus-free planting material of commercial passionfruit varieties, coincides with the need to increase passionfruit production in Colombia in order to meet the increasing internal and external demand for these fruits and their products.

Key words: Fruits, Passion fruit, viral diseases

INTRODUCCIÓN

El maracuyá (*Passiflora edulis*) es una de las especies frutales de mayor demanda en Colombia, alcanzando un consumo de más de 40.000 toneladas en 1994 (DANE). El maracuyá se consume principalmente como jugo en los hogares colombianos, y es parte importante de una industria de jugos que genera más de \$ 100 millones de dólares al año en Colombia (Alpina, *datos no publicados*). El maracuyá es una fuente de ingresos para miles de agricultores de escasos recursos, en los departamentos de Huila, Tolima, Cundinamarca, Caldas, Risaralda, Bolívar, Atlántico y Valle, en donde se cultivan unas 4.500 hectáreas. El maracuyá es también uno de los cultivos no tradicionales más promisorios para la exportación, pero la baja producción y el deficiente mercadeo de esta fruta han

impedido que alcance a satisfacer su potencial actual exportable de 3.500 toneladas.

La baja productividad del maracuyá en Colombia (14 ton/ha) está estrechamente ligada al pobre estado fitosanitario de las plantaciones comerciales (Torres et al, 2000), incluyendo la alta incidencia de virus en el cultivo. Los virus reducen la producción potencial del cultivo (30 ton/ha), deterioran la calidad de la fruta y del jugo, y reducen drásticamente la vida útil de las plantaciones (Chávez et al., 1999).

Brasil, el centro de origen de la *Passiflora edulis* y uno de los mayores productores y exportadores de maracuyá en el mundo, ha fomentado permanentemente el estudio de los virus que afectan esta especie frutal. De 1986 a 1993, se han realizado en Brasil un total de 25 investigaciones sobre los virus que afectan al maracuyá, con miras a implementar medi-

das de control. Estas investigaciones han puesto de manifiesto la presencia de siete virus diferentes en maracuyá morado y amarillo (Kitajima et al., 1986; Chagas et al., 1987; Kitajima, 1995).

Hasta 1992 no se había realizado ninguna investigación sobre la situación de las enfermedades virales del maracuyá en Colombia. Para este año se realizó una prospección preliminar en el Valle del Cauca, uno de los principales departamentos productores de maracuyá en Colombia, habiéndose encontrado varias plantaciones comerciales donde la incidencia de virus era del 100%. Observaciones de microscopía electrónica realizadas en esa investigación, permitieron detectar la presencia de un complejo viral en estas plantaciones (Varón et al., 1992). Este primer trabajo motivó la iniciación de este proyecto financiado por COLCIENCIAS para caracte-

rizar los virus que afectan la producción, calidad y expansión del maracuyá y otras pasifloras de importancia económica en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y Mantenimiento de Virus

Durante el proyecto de caracterización de virus que afectan al maracuyá y otras pasifloras de importancia económica en Colombia, se visitaron plantaciones en 11 departamentos del país (Chávez et al., 1999). De un total de 340 muestras se detectaron dos patógenos de aparente naturaleza viral, uno filamentoso y otro isométrico.

Para la caracterización del patógeno filamentoso, se seleccionó un aislamiento de maracuyá procedente de Roldanillo, Valle del Cauca. Las partículas isométricas se aislaron a partir de plantas de maracuyá provenientes del municipio de Lebrija, Santander. Los síntomas observados en maracuyá, asociados a las partículas filamentosas, consistían en malformación foliar, mosaico y

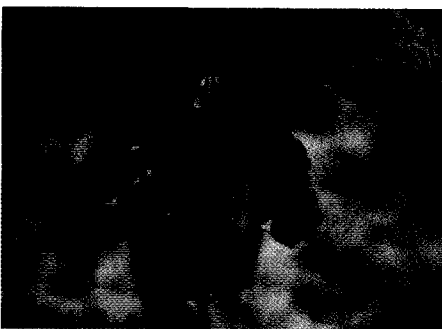


Figura 1. Síntomas foliares inducidos por el *Virus del mosaico de la soya* en maracuyá.

ocasionalmente manchas anilladas (Figura 1).

Los síntomas asociados a las partículas isométricas se observaron como un mosaico amarillo con tendencia a la formación de bandas en las hojas (Figura 2). El virus filamentoso se mantuvo en maracuyá y se propagó en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Black Turtle Soup-B. El patógeno isométrico se mantuvo y propagó en maracuyá.

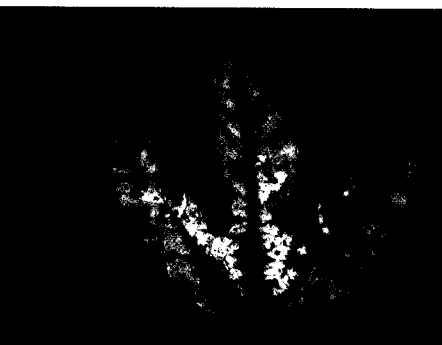


Figura 2. Síntomas foliares inducidos por el *Virus del mosaico amarillo del maracuyá* en maracuyá.

Caracterización preliminar de los patógenos

La metodología y resultados de los análisis de microscopía electrónica, y pruebas de patogenicidad han sido publicados anteriormente (Varón et al, 1992; Chávez et al., 1998). Las pruebas serológicas se realizaron con un anticuerpo monoclonal para potyvirus (Agdia, Inc., Elkhart, IN, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor; y con un antisuero producido para el *Virus del mosaico amarillo del maracuyá*, gentilmente donado por el Dr. E. Kitajima de la Universidad de Brasilia, Brasil. Para este último ensayo se implementó la técnica de inmuno-microscopía descrita por Derrick (1973).

Purificación y caracterización molecular

Las partículas filamentosas se purificaron parcialmente a partir de un peso dado de tejido de frijol infectado, homogenizado en dos volúmenes de una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0,5 M, pH 7,5, a la cual se le adicionó 0,5% de sulfito de sodio, y una cuarta parte del volumen de cloroformo y tetracloruro de carbono. Esta mezcla se homogenizó completamente y centrifugó a 5.000 rpm por 5 minutos. Después de filtrar el sobrenadante a través de lana de vidrio, se adicionó glicol polietileno (PEG) al 6%, agitando por 2 horas a 4° C, seguido por una centrifugación a 8.500 rpm por 10 minutos. El precipitado se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0,25 M, pH 7,5.

El virus isométrico se purificó a partir de un peso determinado de tejido infectado, mezclado en tres volúmenes de una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0, con 0,5% de sulfito de sodio. Esta mezcla se centrifugó a 5.000 rpm por 5 minutos, seguida por otra centrifugación a 28.000 rpm por 90 minutos en un colchón de sacarosa al 20%. El precipitado se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio al 0,01 M, pH 7,0

De la suspensión de partículas virales filamentosas se purificó el ácido ribonucleico (ARN) viral (v), según el procedimiento descrito para el procedimiento 'Rneasy' indicado para células y tejido de plantas (QIAGEN Inc, Santa Clarita, CA, USA). La síntesis del ácido desoxiribonucleico (ADN) complementario (c) a partir del ARNv, se realizó desarrollando la reacción de la transcriptasa reversa "Superscript" Stratagene, La Jolla, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron aproximadamente 1000 ng del ARNv como precursor, mezclado con el oligonucleótido:

ATGGTWTGGTGYATYGAAAATGG
(SCM/MDM),

como iniciador (primer) para el extremo 3' de especies del género *Potyvirus*, que incluye

parte del gen de la proteína de la cubierta (CP). Se utilizó también un iniciador de 19 timinas denominado "cola de poli-T", complementario a la región viral no codificante (UTR). El ADNc se amplificó en 25 µL de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando 1.25 unidades de polimerasa "Taq" (Promega, Madison, WI, USA), 50 pM de cada iniciador (SCM+MDM/oligo-d-A), mezcla de deoxinucleótidos (A, C, G y T) 0,2 mM y cloruro de magnesio 4 mM. La PCR se desarrolló en un termoregulador (MJ Research, Watertown, MA, USA), programado de la siguiente forma: 94 °C/30 s.; 40 °C/2 min.; 72 °C/2 min., por 39 ciclos y un ciclo final de 72 °C/5 min.

El producto obtenido por PCR se obtuvo según el procedimiento para purificación de ácidos nucleicos "Magic PCR System" (Promega, Madison, WI, USA). Los extremos cohesivos del fragmento amplificado fueron completados con deoxinucleótidos usando la fracción larga de la polimerasa de ADN I (Klenow). Este fragmento, se ligó en el vector pCR-Script SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, esta reacción se utilizó para transformar *Escherichia coli* (DH5 α).

En el caso del virus isométrico, los clones específicos se produjeron a partir del ácido nucleico viral extraído de las preparaciones parcialmente purificadas, usando el Kit Rneasy Plant Mini, siguiendo las instrucciones del productor (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Los productos de ADNc fueron sintetizados de acuerdo al procedimiento modificado (1996, "Protocols and applications guide, third edition", Promega) de Gubler y Hoffman (1983), usando primers aleatorios de seis nucleótidos. La síntesis de primera cadena de ADNc se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50 µl de 50 mM Tris HCl pH: 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, dNTPs 1mM each, 30 µCi de α³²dATP (≈ 3000 Ci/mmol), 200 ng de primers hexámeros aleatorios (random primers), 60 U de Rnasin, 4-5 µg de ARN, 600 U de SuperScript II RT (Gibco) por 1,5 horas a 37 C.

Para la síntesis de segunda cadena se utilizó una concentración de 50 mM Tris HCl pH: 7,2, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 50 µg de albúmina de Suero Bovino, 20 U de ADN Polimerasa I (Gibco), 2 U de RNasa H (Promega), durante cuatro horas a 14 C. La reacción se inactivó por calentamiento a 70 C durante 19 minutos y enseguida se enfrió en hielo. Para la reacción de fill in se adicionó 10 U de T4 ADN polimerasa y una mezcla de 3mM de dNTPs, se incubó por 10 minutos a 37 C. La enzima se inactivó por adición de 3 µl de 0,5 M de EDTA.

El ADNc fue fraccionado en Sephacryl S-400 (Pharmacia) y ligado en el plásmido defosforilado BlueScript KS(+), cortado con la enzima SmaI. Se generaron clones con un

rango de 300-1000 pares de bases.

Las reacciones de secuencia se realizaron por el procedimiento de terminación en cadena de dideoxinucléotidos (Sanger et al, 1977) usando como enzima una "sequenasa T7 versión 2.0" (USB, Cleveland, OH, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de secuencia se desarrolló utilizando los programas estadísticos Dnasis (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia) y Seqaid II (Rhoads and Roufa, Kansas State University, Manhattan, KS, USA), con secuencias obtenidas a través del servicio de búsqueda de similaridad de secuencias del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI), desarrollado por Altschul et al (1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el caso del virus filamentososo, se determinó serológicamente que se trataba de una especie del género *Potyvirus*, por lo que el uso de los iniciadores descritos arriba, permitió la amplificación y secuenciación de los extremos de un clón de 700 pares de bases (pb), para un total de 500 nucleótidos (nt). Uno de los extremos del clón original corresponde al extremo 3' de la cápside protéica (CP) y la otra porción terminal a la región no codificante conocida como UTR ("Untranslated region"). Al comparar las secuencias obtenidas con las bases de datos del Banco mundial de Genes (Altschul et al, 1997), se constató que el virus filamentososo es una especie del género *Potyvirus*, y específicamente una variante del *Virus del mosaico de la soya* (SMV) adaptada al maracuyá. Tanto las secuencias (Figura 3a,b) obtenidas para la CP (255 nt) como para la UTR (299 nt), mostraron porcentajes de identidad del 98% con cepas del SMV tanto de Estados Unidos como de Japón. La CP y UTR del SMV de la cepa del maracuyá aislada en Colombia, solo mostraron porcentajes de identidad del 76% y 61%, respectivamente, con los fragmentos correspondientes del genoma del *Passionfruit woodiness virus*, el potyvirus más ampliamente difundido en maracuyá a nivel mundial. Estos resultados concuerdan con la caracterización previa de otro aislamiento del virus encontrado en maracuyá durante los inicios de esta investigación (Varón et al., 1992; Benschel et al, 1996).

Las secuencias de dos clones del virus isométrico (Figura 4a, b), con tamaños de 473 y 324 bases, pertenecen al ORF1 putativo de una especie del género *Tymovirus*, diferente a las otras especies de este género caracterizadas a nivel molecular. La especie de tymovirus más cercana al aislamiento colombiano, resultó ser el *Kennedy yellow mosaic virus*, con porcentajes de identidad en las secuencias correspondientes de solo 66% y 76%. Sin embargo, el tymovirus colombiano induce síntomas similares en maracuyá a un tymovirus descrito

(a)							
1	GTCATTGAG	AATGGCACAT	CTCCAGATGC	TAATGGCGTG	TGGGTGATGA	TGGATGGAAA	
61	GGAACAGATT	GAATATCCGC	TGAAACCCAT	TGTCGAAAAT	GCAAAACCAA	CCTTGAGACA	
121	AATCATGCAC	CATTTCTCAG	ATGCAGCAGA	AGCTTACATT	GAGATGAGAA	ATTCTGAAAG	
181	TCCGTATATN	CCTAGATATG	GACTACTGAG	GAATTTGAGA	GATAGAGAGC	TAGTCTCGTA	
241	TNTTTTGATT	TCTAT					
(b)							
1	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TGGACAACAA	ACATTGCCGC	ACCTCGGCCA	CTAGACGTGA	
61	TAAATCACT	CTTCAAAGGG	CTCCGGCAAC	ACAATGGTTC	TCCCCTGCCAT	TCATAAACTA	
121	TAACATAAAG	CACACTGGGG	TGGTTAAAC	CACACTAAAC	AGAAACATTA	TTTGGTGTATG	
181	CGATCACACT	ATATGTAAG	ACAGTGCAAC	TATTATATTA	TAGTAACTA	TAAAGCGACC	
241	CGAAATGATA	ACTGTGACCA	AGTTTACTTA	GCCTTTACTG	CGGTGGGCC	ATGCCAAA	

Figura 3. Secuencias de los extremos de un clon del *Virus del mosaico de la soya* que contiene parte de la región codificadora del gen de la cápside protéica (a) y la región no codificadora (UTR) del extremo 3' (b).

(a)							
1	GTCAGATGGC	CTTTTAACTC	GCTCTGGACG	CTCTCAATCC	GACGTCTCAC	CGAGATTCAT	
61	GGGGGCACCC	AGTGCTCGAG	TCGGTTCACG	ACTCCCTAAA	GCACCTCTTG	ACTACGTTC	
121	CTTGGTCAGT	CTCTCCCGAC	CAAATTCCTT	TTCTCCTCAA	AGCCCGAGTA	CCAGTCTCCG	
181	GCCTCTCTAC	CCTGCCTCAC	CCTCATCCAG	TGCACAAGAC	GCTGGAAACC	AACCTCTCT	
241	TCAATCACTG	GAGCTTTCTC	GCGACCGAGA	AATCCTCCGT	GATTTTCATG	AAACCATCGA	
301	AGTTCGCAA	GCTCCAAGG	AAGAACAAA	ACTTCCACGA	GCTCTGCAAC	TATCGAGTCA	
361	CTCCAACCGA	CTCCGTTCCG	TATCTTACCA	CCAGCCAGG	CTGAATGGCG	GGAAGGAAGA	
421	AAGCAGCGAG	ATTTTCGAAA	GTCTCACCAG	GGTAGACCGG	GGTGTGAGGG	GTG	
(b)							
61	AACAATTATGT	CACCATCCTC	CTTGACAAGCAT	TTCAGCCCTC	TCTTCCAAGT	CACGCCT	
121	CTTGTCGCCCT	CACCTCGCTC	TCTATGGGGCGT	CAAGTTTCTT	TGGGGATCT	TCCAATCCCTC	
181	TCCGGAACATA	CAACTCCAAC	GACATGTTTT	TCTCGGCCCT	CAACAGCAGAAA	TCAAT	
241	TTGTTCAACAG	CTCCGGAGAT	TCCACCCTT	TCCCTTCTT	TCGCTCCCCT	TATCAA	
301	TCGAGAGGCT	CTCGTCTC	CTTTGGT				

Figura 4. Secuencias de dos clones (a y b) del *Virus del mosaico amarillo del maracuyá* pertenecientes al ORF1 putativo o característico del género *Tymovirus*

previamente en Brasil (Crestani et al., 1986) como el *Virus do mosaico amarelo do maracujazeiro* (*Virus del mosaico amarillo del maracuyá* o *Passion fruit yellow mosaic virus*). Estos tymovirus son estrechamente relacionados a nivel serológico según los resultados obtenidos aquí, lo cual sugiere que se trate del mismo virus. Por consiguiente, se conservará el nombre del *Virus del mosaico amarillo del maracuyá* para el tymovirus colombiano, hasta que se caracterice un aislamiento brasileño a nivel molecular.

Los resultados de esta investigación muestran una situación relativamente favorable en cuanto al número de enfermedades virales que afectan al maracuyá en Colombia, en relación al principal productor de maracuyá a nivel mundial, Brasil. Sin embargo, el SMV está ampliamente diseminado en los principales departamentos productores de maracuyá de Colombia, lo cual puede ser consecuencia de la distribución de material propagativo de maracuyá infectado a nivel nacional desde un lugar donde el virus es endémico. Dado el rango amplio de especies hospederas del SMV y su transmisión rápida (no-persistente) por varias especies de áfidos, su control se hace difícil. Este virus es aparentemente el responsable de que las plantaciones de maracuyá afectadas, disminuyan notablemente su producción después del primer año. Igualmente, se ha demostrado que este virus causa la enfermedad conocida como 'hoja o mancha morada' (Figura 5) de



Figura 5. Manchas moradas inducidas por el *Virus del mosaico de la soya* en granadilla

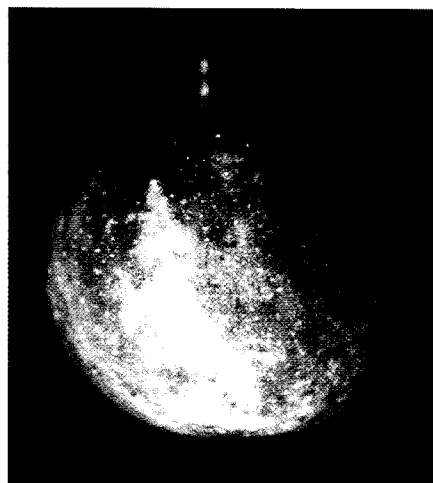


Figura 6. Manchas y depresiones acuosas sobre los frutos de plantas de maracuyá infectadas por el *Virus del mosaico amarillo del maracuyá*

la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.), también expresada en los frutos (Figura 5), enfermedad que ha contribuido a la disminución del área cultivada en esta pasiflora a nivel nacional, así como enfermedades no estudiadas en otras pasifloras de importancia en Colombia, como la badea.

El control del tymovirus colombiano del maracuyá puede ser posible mediante el uso de material propagativo certificado, y el control de insectos vectores (Coleoptera: Chrysomelidae). Aparentemente, estos virus no se transmiten por semilla, pero si tiene el potencial de reducir la calidad del fruto, produciendo depresiones acuosas (Figura 6). Se concluye entonces, que es necesario evitar la infección temprana de las plántulas de maracuyá y otras pasifloras para prolongar la vida útil de las plantaciones de estos frutales de tanta importancia socioeconómica para Colombia. A largo plazo, se debe considerar la posibilidad de mejorar genéticamente estas especies frutales por medios convencionales o moleculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein

database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.

Benschel, D., Pappu, S.S., Niblett, C.L., Varón, F., Morales, F., Hodson, E., Alvarez, E., Acosta, O., y Lee, R. F. 1996. A strain of soybean mosaic virus infecting *Passiflora* spp. in Colombia. *Plant Disease* 80:258-262.

Chagas, C.M., Catroxo, M.H., Moraes de Oliveira, J., y Furtado, E.L. 1987. Ocorrência do vírus do clareamento das nervuras do maracujazeiro no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 12: 275-278.

Chávez, B., Varón, F., Morales, F., Castaño, M., Arroyave, J., y Gálvez, G. 1999. Reconocimiento, transmisión y hospederos de patógenos virales del maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 23: 24-31.

Crestani, O.A., Kitajima, E.W., Lin, M.T., y Marinho, V.L.A. 1986. Passion fruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. *Phytopathology* 76: 951-955.

DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. <http://www.dane.gov.co>

Derrick, K.S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56: 652-653.

Gubler, U., y Hoffman, B.J. 1983. A simple and efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25: 263-269.

Kitajima, E.W., Chagas, C.M., y Crestani, O.A. 1986. Enfermidades de etiología viral e asociadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 11: 409-432.

Kitajima, E.W. 1995. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, Suplemento Especial, 92 p.

Sanger, F., Nicklen, F., y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 74: 5463-5467.

Torres, C., Sánchez, M., Gómez, E., Bravo, N., Marmolejo, F., Rodriguez, H., Díaz, M., Meneses, S., Panesso, F., y Agredo, M. 2000. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de maracuyá *Passiflora edulis* Sims var *flavicarpa* Degener en dos agroecosistemas. *Fitopatología Colombiana* 24: 47-54.

Varón, F., Castaño, M., Arroyave, J., Velasco, A., Villaume, C., y Morales, F. 1992. Complejo viral que afecta las plantaciones de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en el Valle del Cauca. *Fruits* 47: 321-329.

Reprinted with permission from ASCOLFI. Originally published in *Fitopatología Colombiana* 25(2):99-102, Copyright 2001.