



**UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA  
ABREU" DE LAS VILLAS  
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO**



**Etiología y caracterización de la pudrición del cogollo de la palma de  
aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en San Lorenzo, Esmeraldas, Ecuador**

**Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas**

**Autor: FERNANDO RIVAS FIGUEROA**

**SANTA CLARA, CUBA**

**2015**



**UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA  
ABREU" DE LAS VILLAS  
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO**



**Etiología y caracterización de la pudrición del cogollo de la palma de  
aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en San Lorenzo, Esmeraldas, Ecuador**

**Tesis presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas**



**Autor:** Ing. Fernando Rivas Figueroa, MSc.

**Tutor:** Prof. Tit., Ing. Felipe Lidcay Herrera Isla, Dr.Cs.

**SANTA CLARA, CUBA**

**2015**

*Dedicatoria*

*Dedico este trabajo a:*

*Mi esposa Livia Angélica Ordóñez Piña*

*Mi hijos Libia Fernanda Rivas Ordóñez*

*Renato Isaac Rivas Ordóñez*

*Pablo Esteban Rivas Ordóñez*

*Mis nietos Paula Rivas Torres*

*Martín Vizcaino Rivas*

*Sebastián Rivas Torres*

*Mis hermanos*

*Todos mis familiares*

*Al tutor Dr. Cs. Lideay Herrera Isla*

*A los amigos Michel y Alexander*

*Una vez culminado el presente trabajo quisiera agradecer:*

- *A Dios por ser mi fortaleza espiritual en la ejecución y culminación de la investigación.*
- *A mi esposa, hijos y nietos por su incondicional y relevante apoyo y por ser fuente inspiradora y motivación de mi desarrollo académico profesional.*
- *Al Dr. Cs. Felipe Lidcay Herrera Isla por su valioso apoyo en la orientación de la investigación y corrección de la investigación en su calidad de Tutor.*
- *Al Dr. C. Gustavo Bernal por su apoyo brindado en las actividades investigativas en su calidad de Cotutor.*
- *A los Dr. C. Michel Leiva Mora y Alexander Bernal Cabrera por su generoso apoyo brindado en esta investigación.*
- *Al Dr. Virgilio Balmas, Docente Investigador de la Universidad de Sassari, Italia, por su valioso apoyo en la investigación del género Fusarium.*
- *Al Servicio Ecuatoriano de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD por su contribución en la investigación.*
- *A la Asociación de Cultivadores de Palma del Ecuador y las Empresas Palmeras de Los Andes, Palesema, Paipailón, Alespalma y Energy & Palma de San Lorenzo por su aporte en las actividades investigativas de campo.*
- *A los Ings. Alvaro Rivera C y Fabricio Moreno G. por su comprometida colaboración en la ejecución de las actividades investigativas.*
- *Al doctor Orlando Borrás del CIGB, por su colaboración.*
- *A René Cupull, a Anarella, Mileidys y Mayra.*
- *A todas las personas y trabajadores que de una forma u otra contribuyeron en la presente investigación.*
- *A todos, MI GRATITUD ...*

*“El hombre que ha empezado a vivir más seriamente por dentro, empieza a vivir más sencillamente por fuera”*

*Ernest Hemingway*

**RESUMEN**

La pudrición del cogollo (PC) es la enfermedad más devastadora de la palma de aceite en América Latina; en Ecuador ha causado pérdidas superiores a 150 millones de dólares. Para la caracterización de los síntomas, determinación de la incidencia y severidad; se realizaron muestreos en las empresas palmeras: Palesema, PDA, Palpailón, Energy & Palma y Alespalma. En laboratorio, se realizó la caracterización cultural, morfológica, bioquímica e identificación molecular de los agentes asociados con la PC. En San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, se observaron síntomas de clorosis en hojas jóvenes, amarillamiento progresivo, deformación de folíolos, lesiones necróticas, necrosis descendente y pudrición del cogollo. La incidencia promedio fue del 66,75 %, mientras la intensidad de ataque promedio fue de 46 %. *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. solani* y *F. subglutinans* causaron lesiones necróticas en la flecha, mientras solo *F. oxysporum* y *F. proliferatum* provocaron pudrición descendente. *Erwinia* spp., no reprodujo síntomas de la pudrición del cogollo. Finalmente se observó correspondencia entre los criterios culturales, morfológicos y la identificación molecular sobre la base del porcentaje de homología de las secuencias correspondientes a la región ITS y del factor de elongación 1 $\alpha$ -TEF para todas las especies de *Fusarium* aisladas. Con la identificación de los agentes causales de la pudrición del cogollo, se podrán diseñar alternativas de control para lograr un manejo integrado de la enfermedad y disminuir las pérdidas ocasionadas en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
2.1 La palma de aceite. Requerimientos bioecológicos	5
2.1.1 Taxonomía	5
2.1.2 Importancia económica y social del cultivo de la palma de aceite	6
2.2 Principales cultivares e híbridos en Ecuador	6
2.3 Enfermedades y plagas de la palma de aceite	8
2.3.1 <i>Phytophthora palmivora</i>	8
2.3.2 La pudrición del cogollo. Historia	9
2.3.2.1 Sintomatología de la pudrición del cogollo	10
2.3.2.2 Epifitología de la pudrición del cogollo	15
2.4 Caracterización de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite	17
2.4.1 <i>Erwinia</i> spp	19
2.4.1.1 Clasificación taxonómica	20
2.4.1.2 Características morfológicas	20
2.4.2 El género <i>Fusarium</i>	21
2.4.2.1 Clasificación taxonómica	22
2.4.2.1.1 Características culturales	22
2.4.2.1.2 Características morfológicas	24
2.5 Principales regiones del ADN utilizadas en el diagnóstico molecular de hongos fitopatógenos	24
2.5.1 Espaciadores transcritos internos (ITS)	24
2.5.2 Factor de elongación de la traducción eucariótica 1- $\alpha$ TEF	25
2.5.3 Identificación de especies de <i>Fusarium</i> mediante técnicas moleculares	26
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
3.1 Caracterización sintomatológica y determinación de la incidencia e intensidad de ataque de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en San Lorenzo	30

3.2 Identificación sobre la base de caracteres culturales, morfológicos, bioquímicos y moleculares de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite	36
3.2.1 Caracterización de los hongos asociados	36
3.2.2 Caracterización de las bacterias asociadas	38
3.2.3 Identificación molecular de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite	39
3.3 Evaluación de la patogenicidad de los agentes asociados con la pudrición del cogollo en palma de aceite.	43
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
4.1 Caracterización sintomatológica y determinación de la incidencia e intensidad de ataque de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en San Lorenzo	50
4.2 Identificación sobre la base de caracteres culturales, morfológicos, bioquímicos y moleculares de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite	60
4.2.1 Caracterización cultural y morfológica de hongos asociados	61
4.2.2 Caracterización cultural, morfológica y bioquímica de las bacterias asociadas	71
4.2.3 Identificación molecular de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite	75
4.3 Evaluación patogénica de agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite	79
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>92</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>93</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

El cultivo de *Elaeis guineensis* Jacq. y la comercialización de su aceite, tienen una historia de más de 3 000 años de antigüedad. La palma de aceite es originaria de África ecuatorial occidental; sus semillas fueron traídas a América por los barcos comerciantes que llegaban desde Europa en el siglo XIX (Bernal *et al.*, 2006).

En la actualidad, Asia Suroriental se ha convertido en el mayor productor de aceite de palma. Los aumentos más significativos de la producción durante los últimos siete años se han dado en Malasia (8,5 % por año), e Indonesia (16,9 % por año). La producción de ambos representa el 80,0 % de la producción mundial (Fairhurst y Härdter, 2012).

En América Central y América del Sur, se prevé una considerable expansión para los próximos 20 años. El área más extensa se encuentra en Colombia (29,0 %) donde la mayoría de la superficie plantada se ubica en los Llanos Orientales, al este de los Andes. La segunda y tercera áreas más grandes se encuentran en Ecuador (24,0 %) y Honduras (12,0 %), respectivamente (ANCUPA, 2010).

Los primeros cultivos de la palma de aceite en Ecuador datan del año 1953, cuando Roscoe Scott inició una plantación en el km. 37 de la vía Santo Domingo-Quinindé, con material Dura x Deli, procedente de Honduras (Muñoz, 2011).

Actualmente la palma de aceite es el segundo cultivo perenne más extenso de Ecuador, con más de 280 000 hectáreas plantadas, las cuales generan cerca de 150 000 empleos, tanto directos como indirectos (ANCUPA, 2015). Entre las provincias de mayor producción se encuentran: Esmeraldas, Los Ríos, Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y las provincias orientales de Sucumbíos y Orellana (ANCUPA, 2011). La exportación de aceite en el año 2014 alcanzó más de 183 000 toneladas (FEDAPAL, 2014).

Entre los principales problemas fitosanitarios que limitan el desarrollo del cultivo y por lo tanto su rentabilidad, se encuentra la enfermedad denominada en Ecuador, Colombia y Panamá como pudrición del cogollo o PC. En Brasil se le conoce como amarillamiento fatal, en Surinam spear rot y actualmente es denominada como complejo PC (Louise *et al.*, 2007).

La PC ha sido la enfermedad más devastadora de la palma de aceite en América Latina (Sarria, 2010). En Ecuador se informó por vez primera en 1976 en la zona del Pacífico (Dzido *et al.*, 1978); tres años más tarde se registró en la Amazonía, donde destruyó 10 000 hectáreas entre los años 1992 y 1993 (De Franqueville, 2003; Bernal, 2012). Esta enfermedad ha provocado la pérdida de más de 15 000 hectáreas de plantaciones en San Lorenzo y 8 000 hectáreas en Viche (AGROCALIDAD y ANCUPA, 2015) con afectaciones económicas cercanas a 150 millones de dólares que incluyen 8 000 plazas de empleo directas y 16 000 indirectas. (ANCUPA, 2014 a).

En la PC se reconocen dos formas: una forma letal que es predominante en Ecuador, la Amazonía brasileña y en ciertas zonas de Colombia y Surinam. Existe la forma no letal, con una alta tasa de recuperación, la cual se localiza en los Llanos colombianos (De Franqueville, 2003). Hasta ahora no se conoce si éstas son manifestaciones diferentes de la misma enfermedad, o se trata de fenómenos patológicos o fisiológicos diferentes.

Acorde con Elliott (2009), en Ecuador se han observado diferentes tipos de síntomas. En el cantón San Lorenzo y en la Amazonía se distinguen dos tipos: 1) PC clásica, que afecta rápidamente el cogollo de la palma y descompone el meristema apical, 2) PC crónica, la enfermedad no se propaga con rapidez al cogollo, esto se traduce en un descenso lento y progresivo que conduce a la improductividad del cultivo. En la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, se observa un tercer tipo de PC, conocida como PC de recuperación, la cual es similar a la crónica, excepto que no inhibe permanentemente la división celular en el meristema apical; lo que permite la producción de nuevas hojas y flores en las plantas afectadas.

La primera investigación detallada y publicada sobre los microorganismos asociados con la PC, se realizó en las plantaciones de Lever Brothers en el sureste de la República Democrática del Congo (Zaire) (Dzido *et al.*, 1978). Después de trabajos de campo y laboratorio, se identificó a la bacteria *Erwinia herbicola* (Löhnis) Dye. como el agente causal. Sin embargo, esta bacteria fue aislada de plantas sin síntomas (Laing, 2010).

Los investigadores colombianos (Nieto y Gómez, 1991), enfocaron su atención en varias especies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium solani* (Martius) Appel. & Wollenweber emend. Snyder & Hansen, pues su interés se concentró en un complejo fúngico, que

comprendió a *Fusarium* sp., *Pythium* sp., y *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes Höhn) (Nieto, 1996). El resultado del equipo sugirió que *T. paradoxa* jugó un papel importante en la patogénesis (Gómez *et al.*, 2000).

Los microorganismos aislados con mayor frecuencia a partir de las lesiones necróticas y del raquis de palmas con síntomas de PC, han sido *Erwinia* y *Fusarium*. Estos son probablemente habitantes del filoplano. Intentos por reproducir los síntomas de la pudrición de la flecha mediante la inoculación de los microorganismos aislados, no han tenido éxito. Sin embargo, síntomas de la pudrición común de la flecha, fueron obtenidos al inocular *Erwinia* sp. en plantas de palma de aceite de 19 meses de edad en vivero (Monge *et al.*, 1993).

En los aislamientos realizados en la zona oriental de Colombia, se han encontrado diferentes microorganismos, entre ellos el hongo *T. paradoxa*, varias especies de *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, y bacterias del género *Erwinia*, pero no existen evidencias claras de que estos microorganismos sean los responsables de la enfermedad, ya que no ha sido posible reproducirla (Buitrago y Nieto, 1995; Nieto, 1996; Martínez y Torres, 2007).

Debido a la manifestación de múltiples síntomas de la PC, la presencia de diferentes microorganismos asociados, la ausencia de métodos de inoculación reproducibles y el escaso uso de herramientas moleculares, no se ha logrado identificar la etiología de esta enfermedad en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador, lo cual no permite establecer medidas de control.

Acorde con la situación anterior, el presente trabajo define como **PROBLEMA CIENTÍFICO** a resolver: En San Lorenzo (provincia Esmeraldas, Ecuador), no se ha caracterizado la sintomatología ni se ha determinado la magnitud de los daños ocasionados por la pudrición del cogollo en la palma de aceite. Tampoco se han identificado los agentes causales de esta enfermedad, ni se han caracterizado mediante criterios culturales, morfológicos, bioquímicos, moleculares y patogénicos; lo cual limita el desarrollo de alternativas para el manejo de esta enfermedad.

Sobre la base de esta problemática, se formuló la siguiente **HIPÓTESIS** de trabajo: Mediante la identificación de los agentes causales de la pudrición del cogollo en la palma de

aceite en San Lorenzo, provincia Esmeraldas, Ecuador, y su caracterización basada en criterios culturales, morfológicos, bioquímicos, moleculares y patogénicos, se podrían desarrollar alternativas de manejo de esta enfermedad.

Para comprobar esta hipótesis, se plantean los objetivos siguientes:

**Objetivo general:**

Caracterizar la sintomatología e identificar los agentes causales de la pudrición del cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador.

**Objetivos específicos:**

1. Caracterizar la sintomatología de la pudrición del cogollo de la palma de aceite y determinar su incidencia y severidad en campo.
2. Identificar mediante caracteres culturales, morfológicos, bioquímicos y moleculares los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite.
3. Evaluar la patogenicidad de los agentes asociados con la pudrición del cogollo en palma de aceite.

La **NOVEDAD CIENTÍFICA** de este trabajo, consistió en el esclarecimiento de la causa de la pudrición del cogollo de la palma de aceite y la caracterización de la sintomatología en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador. Por vez primera, se informa para Ecuador, a las especies *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. semitectum* (Berkeley & Ravenel) asociadas con plantas con síntomas de pudrición del cogollo.

Desde el punto de vista práctico, con la identificación del agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite, se contribuirá a desarrollar alternativas de control que podrían formar parte del manejo integrado de la enfermedad. Con este resultado se podrá apoyar a los programas de mejoramiento genético para obtener variedades, híbridos resistentes o tolerantes a la pudrición del cogollo de la palma de aceite en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 La palma de aceite. Requerimientos bioecológicos**

Según las investigaciones y datos históricos, la palma de aceite (*E. guineensis*) es originaria de las costas del golfo de Guinea en el África Occidental, y se ha dispersado de forma natural a lo largo de las márgenes de los ríos. Desde tiempos remotos la planta crece de forma silvestre, y su fruto es utilizado para la extracción del aceite con vista al consumo humano (Bernal, 2001).

La palma de aceite llegó a América tropical debido a los colonizadores y comerciantes de esclavos portugueses; quienes utilizaron los frutos de la palma de aceite como alimento en los viajes transatlánticos, según la historia en el siglo XVI. De esta manera, la palma de aceite se estableció por primera vez de forma antrópica, detrás de la línea costera, en la región de San Salvador, antigua capital de Brasil (Bernal, 2001).

Se cultiva en suelos francos a franco arcilloso, sueltos, profundos, bien drenados. Los suelos de origen aluvial y volcánico, son los más apropiados para el cultivo de palma de aceite. Asimismo, se ha cultivado en muchas áreas que no son óptimas para su desarrollo, debido a que la palma se ha adaptado a un régimen climático de lluvia de verano y sequía de invierno (Corley y Tinker, 2003 a).

Entre los requerimientos del cultivo de la palma de aceite se destacan: 5,5 o más horas luz por día con intensidades iguales o superiores a  $16 \mu\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ , 1 500 y 2 200 mm anuales y mensuales mayor a 100 mm de precipitación, humedad relativa 75-85 %, temperaturas superiores a los 22 °C. En San Lorenzo la temperatura diaria varía de 23-32 °C, con aproximadamente 3 100 mm anuales de precipitación, 1 300 horas luz solar anuales y a una altura inferior a los 300 msnm (ANCUPA, 2014).

#### **2.1.1 Taxonomía**

Botánicamente, la palma de aceite se conoce con el nombre de *Elaeis guineensis*. Este nombre fue dado por Jacquin en 1763, basado en la palabra griega *ελαια*, de olivo, debido

a sus frutos ricos en aceite, y *guineensis* que hace honor a la región de Guinea de donde se considera originaria (CIRAD, 2009). Para la clasificación taxonómica se siguió el sistema propuesto por Cronquist (1981):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidae

Orden: Arecales

Familia: Arecaceae

Subfamilia: Coryphoideae

Género: *Elaeis*

Especie: *Elaeis guineensis* (Jacquin, 1763)

### **2.1.2 Importancia económica y social del cultivo de la palma de aceite**

La palma de aceite representa uno de los cultivos de mayor crecimiento en el agro ecuatoriano (7 % anual en promedio en la última década), con un total de 280 000 hectáreas plantadas y una producción anual de 500 mil t de aceite crudo, de las cuales cerca de 300 mil t son exportables (25 % de este volumen se exporta con valor agregado). La exportación de aceite alcanzó más de 183 000 t en el año 2014. Este cultivo representa el 15 % del PIB agrícola y el 1,8 % del PIB total del país (FEDAPAL, 2014).

Los beneficios sociales, económicos y ambientales que genera el cultivo de esta oleaginosa, han sido factores fundamentales para que los agricultores del Ecuador hayan acogido a este cultivo y se desarrolla en zonas que van desde la frontera norte de la provincia de Esmeraldas, en la zona de San Lorenzo, hasta la provincia de El Oro al sur del país, al igual que en las provincias de Sucumbíos y Orellana en el Oriente ecuatoriano (ANCUPA, 2014b).

### **2.2 Principales cultivares e híbridos en Ecuador**

Los tipos de palma de aceite más relevantes se establecen según el grosor del endocarpio del fruto, característica íntimamente relacionada con la producción de aceite. También existe una clasificación de esta palma acorde con el color de los frutos (Borrero, 2006).

Pisífera (P X P): Son palmas cuyos frutos prácticamente no tienen endocarpio, sino un cartílago blando. Las plantas se caracterizan por tener un gran porte y una alta producción de flores femeninas, que generalmente no logran culminar la formación de frutos. Carecen de interés para cualquier cultivo comercial (Borrero, 2006).

Dura (D X D): Este tipo de palmas se cultivó comercialmente en el mundo hasta finales de la década de los sesenta. Su principal característica fue la presencia de un gran endocarpio de dos a ocho milímetros de espesor en los frutos, en detrimento del porcentaje de pulpa, y por tanto, del contenido de aceite. Aún quedan unas pocas áreas en plantaciones comerciales sembradas con este tipo de palmas, que son poco rentables y competitivas (Borrero, 2006).

Ténera (D X P): Por ser un híbrido proveniente del cruzamiento de dura por pisífera, el endocarpio del fruto es delgado y la proporción de pulpa bastante mayor. Por ende, el contenido de aceite es significativamente más abundante. Al hacer un corte transversal de un fruto ténera, se observa un anillo de fibras oscuras adyacentes al endocarpio. Estas características facilitan la distinción entre duras y téneras, cuando el espesor del endocarpio deja alguna duda. Las palmas de este tipo son las más establecidas en plantaciones comerciales a escala mundial (Borrero, 2006).

### **Híbrido interespecífico Coarí x La Mé**

Desde los años setenta, varios países desarrollaron híbridos entre la palma de aceite americana, *Elaeis oleífera* (Kunth) Cortés., y la palma de aceite africana, *Elaeis guineensis* Jacq. El resultado del cruce fue un híbrido interespecífico denominado O x G (Alvarado *et al.*, 2013).

Estos primeros cruzamientos se plantaron en varias plantaciones de Colombia, Ecuador e Indonesia, sin conocerse su potencial productivo ni sus limitaciones. Esto fue un grave error, pues pasado el tiempo se descubrió la baja productividad y pobre extracción de aceite; situación que disminuyó el interés de investigadores e inversionistas de este material (Alvarado *et al.*, 2013). No obstante, a pesar de estos resultados negativos se comprobó la tolerancia de las palmas a la PC y a otras enfermedades y plagas. Se determinó la calidad especial de su aceite comparado con el de la Palma Africana (Alvarado *et al.*, 2013).

Este híbrido es una alternativa excelente a *E. guineensis* en el caso de los productores de palma de aceite afectados por la denominada PC, ya que ha servido para atenuar la repercusión de esta enfermedad en plantaciones de palma de aceite de Colombia y el Ecuador (FAO, 2013; Barba y Baquero, 2013).

### **2.3 Enfermedades y plagas de la palma de aceite**

El cultivo de la palma de aceite en América Latina es afectado por numerosas plagas y enfermedades, que limitan seriamente la producción y exportación de aceite (De Franqueville, 2003). Entre las principales enfermedades se encuentran: la enfermedad del anillo rojo, causada por el nematodo del cocotero (*Bursaphelenchus cocophilus* Cobb.), la marchitez sorpresiva causada por el protozoo flagelado *Phytophthora staheli* McGhee., la pudrición basal del estípote (*Ganoderma* spp.) y la PC; esta última constituye una de las mayores amenazas para el cultivo (ANCUPA, 2015).

Asimismo, dentro de las principales plagas insectiles que afectan la palma de aceite en Ecuador se destacan: *Rhynchophorus palmarum* Linneo (conocido como picudo de la palma de aceite, que causa daño directo pues sus larvas cavan galerías en el tallo hasta alcanzar el meristema central, y es el vector principal de la enfermedad Anillo rojo). *Sagalassa valida* Walker. (Lepidóptera: Gryphopterigidae, la larva barrena y destruye el sistema radical y se produce un cambio de coloración o pudrición de raíces de la palma de aceite) (Corley y Tinker, 2003b; ANCUPA, 2015).

#### **2.3.1 *Phytophthora palmivora* (Butler)**

La hipótesis de *Phytophthora* como causante de la PC fue propuesta por Renard y Quillec (1984). El propósito del trabajo fue buscar los cromistas *Phytophthora* y *Pythium*, con el uso de medios de cultivo específicos, así como trampas o cebos elaborados a partir de la introducción de tejido infectado en frutos de manzana (Martínez *et al.*, 2008 b). La proporción muy baja de aislados obtenidos, llevó a la conclusión de que estos oomycetes no intervenían en la PC. Recientemente, se ha postulado que la lesión inicial de la PC es causada por *Phytophthora palmivora*, que infecta el tejido de la planta inmadura en la yema apical (Martínez *et al.*, 2008 b).

En palmas de vivero, las lesiones pequeñas son visibles tres o cuatro días después de la infección inicial y, si las condiciones climáticas favorecen la infección, las hojas pueden estar infectadas por el contacto físico. La infección penetra a través de la yema y causa la muerte de la próxima hoja emergente (Fairhurst y Härdter, 2012). Ensayos de protección con Fosetil-Al (Aliette) y Metalaxil conducidos durante varios años han resultado infructuosos (De Franqueville, 2001).

### **2.3.2 La pudrición del cogollo. Historia**

La enfermedad de la palma de aceite conocida como PC afecta a decenas de miles de hectáreas de palma de aceite en América del Sur y América Central. Esta enfermedad ha destruido plantaciones completas en Panamá, Colombia, Surinam, Brasil y Ecuador (De Franqueville, 2001; 2003).

En Ecuador las primeras observaciones precisas sobre la fecha en la cual fue informada la PC datan de 1976, pero es probable que la enfermedad haya estado presente durante varios años sin ser detectada (Dzido *et al.*, 1978; Bernal, 2014).

Por más de cuarenta años, el agente causal de la PC no ha sido identificado. Según información del Centro de Investigación de Palma de Aceite (CENIPALMA) de Colombia, *Phytophthora palmivora* fue el agente causal de las primeras lesiones de esta enfermedad. Ellos afirmaron que luego del ataque de *P. palmivora*, se observó la presencia de patógenos oportunistas como *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp., *Thielaviopsis* sp. y *Rhizoctonia* sp., así como la presencia de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Erwinia*. Durante el proceso de la PC se ha observado la presencia de *Rhynchophorus palmarum* L. (Martínez *et al.*, 2010).

Según datos de ANCUPA (2011), en la provincia de Esmeraldas en la zona de San Lorenzo, con una superficie de 20 786 ha en el año 2010, la PC provocó la pérdida de 4 000 ha. Esto representa aproximadamente 572 000 plantas de palma de aceite que fueron afectadas, lo cual demostró el gran potencial de daño que representa esta enfermedad para el sector palmicultor de Ecuador.

ANCUPA informó que la disminución en el volumen de fruta de palma producida en la zona de San Lorenzo, causó el cierre de una de las cuatro extractoras de aceite en 2013. Por esa causa, la producción de fruta de palma de las plantaciones propias de las cuatro extractoras de San Lorenzo pasó de un volumen de 323 000 t en 2009 a 204 040 t en 2013. Se calculó una reducción de la producción de aceite aproximadamente en un 36,83 % (ANCUPA, 2014a). En San Lorenzo existen 144 palmicultores, entre pequeños, medianos y grandes, “quienes han sido seriamente afectados por la PC en los últimos 5 años” (AGROCALIDAD, ANCUPA, 2015).

### **2.3.2.1 Sintomatología de la PC**

Las palmas presentan una pudrición de la primera flecha en el peciolo con caída de este, luego se extiende a todas las flechas, lo que ocasiona el retiro de las mismas con mucha facilidad. Paralelamente ocurre un amarillamiento de las hojas jóvenes, que avanza hasta las hojas medias, que se necrosan y mueren. La pudrición es acuosa, de color blanco amarillento y con olor desagradable (Figueroa *et al.*, 1984).

Según observaciones de Turner (1988), la sintomatología de la palma se manifiesta por la aparición de parches necróticos acompañados de clorosis leve en los folíolos inferiores de las hojas centrales. Posteriormente los folíolos de la flecha se necrosan; se observa clorosis en las hojas centrales más jóvenes y pudrición fétida de la región meristemática.

El primer síntoma de la PC consiste en el desarrollo de parches cloróticos o de color pardo en los folíolos basales de las hojas más jóvenes. Posteriormente se nota una clorosis en algunas de las hojas desde la posición 1 hasta la 10. La clorosis y la necrosis ocurren antes de la pudrición de la base de la flecha y del cogollo (Chinchilla, 1989).

Jiménez (1991) indicó que la primera manifestación del daño es la presencia de un amarillamiento tenue de las hojas jóvenes del tercio superior de la palma, sin presentarse aún daño aparente de las flechas o de otros órganos. A medida que los síntomas progresan, el amarillamiento se hace más intenso a nivel de las hojas y estas inician un secamiento en los ápices y márgenes de los folíolos. En este estado, una o varias flechas pueden estar total o parcialmente afectadas por una pudrición húmeda de color crema o pardo, que invade los

folíolos plegados y aún los tejidos internos peciolares. A consecuencia de esta pudrición, una o varias flechas se doblan. En estados avanzados, la pudrición se extiende al meristema apical, bases peciolares y primordios florales (ANCUPA y AGROCALIDAD, 2013).

En dependencia de las condiciones climáticas, edad y estado de desarrollo de la palma; esta puede morir en un período que puede variar entre 4 a 8 meses después de observados los primeros síntomas. Cuando la enfermedad ha avanzado, se presenta una pudrición bacteriana, húmeda y con mal olor, que coloniza los tejidos, desciende hasta el meristema y puede provocar la muerte de la palma (Jiménez, 1991).

Para Nieto (1993), los síntomas de la PC varían en dependencia de las condiciones climáticas, del suelo, la resistencia genética de la palma y del patógeno involucrado. Los síntomas externos más comunes son: pudrición de flechas, clorosis, moteado, amarillamiento, hoja quebrada y hoja pequeña o corta. No existe un síntoma inicial ni una secuencia u ordenamiento en la aparición de éstos; cada síntoma puede presentarse solo o combinado con los demás, y no todos inducen la PC.

*Pudrición de Flechas.* En algunas palmas se observan manchas cafés con bordes amarillos o cremas en el borde de los folíolos de las flechas, las cuales pueden alcanzar el raquis y por éste llegan a las hojas en formación o al cogollo y causan su pudrición. Algunos folíolos se necrosan, cambian de color y mantienen una consistencia dura hasta que se secan totalmente; otros toman un aspecto acuoso, de color gris o crema y se quiebran a la menor presión que se les aplique (Nieto, 1993).

*Pudrición del cogollo.* Este síntoma ha dado el nombre a la enfermedad. Puede ser de consistencia seca o húmeda. En el primer caso, los bordes de los folíolos son de color ladrillo, adquieren tonalidades oscuras y los raquis y pecíolos de las flechas en formación presentan manchas cafés brillantes, que se agrietan y dan el aspecto de corcho. En el segundo caso, el tejido se descompone, reblandece y adquiere olores fétidos como a fermento, añejo o un olor típico. Esta pudrición, en un corte horizontal, se observan manchas oscuras de consistencia blanda. Si el cogollo se abre longitudinalmente, puede encontrarse el raquis y los folíolos con coloración rojiza o café, o una masa amorfa en casos de PC muy avanzados (Nieto, 1993).

*Amarillamiento.*- Se presenta únicamente en las primeras tres o cuatro hojas jóvenes a medida que se forman las hojas nuevas, las anteriores cambian a verde. Cuando las palmas afectadas no se tratan oportunamente, todas las hojas del primer anillo pueden amarillarse y en este caso las puntas de los folíolos de algunas hojas se tornan rojizas y se secan (Nieto, 1993).

*Moteado.* No es un síntoma que caracterice la enfermedad y se presenta independientemente de las pudriciones de flecha-cogollo; sin embargo, palmas con pudriciones de la flecha acentúan el síntoma de moteado. Los moteados leves o moderados desaparecen con los cambios de clima y buenas prácticas agronómicas (Nieto, 1993).

*Clorosis.* Es un síntoma difícil de valorar. En algunas palmas precede a los amarillamientos, y en otras aparece y desaparece con las prácticas agronómicas y los cambios de clima (Nieto, 1993).

*Hoja quebrada.*- Puede presentarse en flechas u hojas, sola o acompañada de síntomas del complejo. Aparentemente es un síntoma de debilitamiento y se desconoce si está relacionado con la enfermedad (Nieto, 1993).

*Hojas cortas.*- En palmas de 2 a 4 años se presenta una reducción progresiva del tamaño de las hojas del primer anillo, hasta que la última en formarse alcanza sólo unos pocos centímetros, en comparación con los 3 o 4 m de las hojas normales. Por otra parte, cuando una palma enferma empieza su recuperación, las primeras hojas que se forman no alcanzan la longitud normal, lo cual se logra cuando la recuperación es completa; en este caso el progreso del acortamiento es inverso al síntoma de PC en palmas jóvenes (Nieto, 1993).

Zambrano (1991) indicó que en casi todos los casos de ataque de la PC se ha observado un quebramiento de la flecha que está próxima a ser la hoja No 1. El doblamiento se observa a nivel del tercio inferior cercano al cono cerrado de la palma y posteriormente alcanza las demás flechas. Este síntoma se encuentra asociado con una pudrición interna de color salmón, pero la pudrición no alcanza el meristema apical.

El colapso de flechas se detecta en el nivel del tercio inferior que alcanza las demás flechas, éstas a su vez se pudren rápidamente hasta que la palma pierde totalmente todas sus flechas y se encuentra asociada con una pudrición interna profunda y con un olor desagradable que no alcanza a afectar el meristema. La hoja quebrada aparentemente es consecuencia del daño directo en la flecha o indirecto por un daño previo en el cogollo (Nieto *et al.*, 1996).

Cuando la enfermedad llega a este punto ocurre su muerte biológica, que es precedida por lo que se conoce como muerte productiva. Se llama así porque en ella se crean condiciones que atraen insectos (*R. palmarum*) y agravan el problema (Nieto *et al.*, 1996).

La PC se desarrolla más rápidamente en las palmas jóvenes que en las palmas más viejas. En muchos casos, la pudrición deja de avanzar antes de que alcance los meristemas. Siempre que haya reemisión de hojas, ella se caracteriza por la emisión de nuevas hojas, pequeñas y deformadas y luego en la emisión de hojas normales, lo cual lleva a una reemisión total. El mismo autor mencionó que hay dos formas de PC: una forma letal, que es predominante en el Ecuador, la Amazonía Brasileña y en algunas zonas de Colombia, y una forma no letal con una tasa alta de recuperación de la palma que se encuentra principalmente en la zona oriental de Colombia (De Franqueville, 2001; 2003).

Zambrano *et al.* (2004) reportaron que los síntomas comienzan con un amarillamiento de hojas nuevas, las palmas muestran una clorosis leve de folíolos inferiores de una de las hojas centrales, amarillamiento de las hojas jóvenes y un colapso o caída de la flecha próxima a ser la hoja número 1.

La PC avanza por el paquete central de hojas no diferenciadas hasta afectar la zona meristemática, lo cual inhibe la emisión de nuevas hojas para continuar con el proceso de desarrollo de una palma sana. Cuando hay recuperación de las plantas se observa inicialmente la emisión de hojas y folíolos cortos, y posteriormente comienzan a surgir hojas normales. La PC, como se indicó previamente, conduce al colapso de las nuevas flechas, el cual constituye el síntoma más conocido de la enfermedad. La situación más crítica se presenta en la zona del cogollo. En esta parte de la palma se observa pudrición severa de los tejidos más tiernos, que pueden tener diferentes grados de severidad con recuperación relativamente rápida del proceso de emisión de nuevas flechas en los casos menos severos,

hasta la formación de un cráter (causado por la muerte y descomposición de los tejidos más tiernos), con la posibilidad de recuperación en algunos casos (Martínez *et al.*, 2007; ANCUPA y AGROCALIDAD, 2013).

Otro síntoma asociado con la enfermedad, consiste en un secamiento de los folíolos en palmas adultas, esto es el resultado del ataque del organismo que inicia el proceso de infección. Cuando se desintegran los tejidos, ocurre lo que se denomina “mordisco”, el cual se utiliza como método de diagnóstico, porque se observa la pérdida del ápice de los folíolos (Martínez *et al.*, 2007; ANCUPA y AGROCALIDAD, 2013).

Chinchilla (2008), señaló que las pudriciones y los secamientos de los tejidos que forman el cogollo de las palmas (normalmente acompañados de hojas jóvenes parcialmente amarillas), constituyen el problema fitosanitario más importante de la palma de aceite en América tropical.

Elliott (2009) indicó que en Ecuador se distinguen tres tipos de PC, las cuales se conocen como clásica, crónica y de recuperación, cuya principal diferencia es la tasa de desarrollo de la enfermedad y/o la capacidad de la palma para responder a la infección del potencial patógeno.

En la PC clásica, la enfermedad afecta rápidamente el cogollo de la palma y descompone el meristema apical, probablemente porque la palma no tiene tiempo para producir defensas contra el agente fitopatógeno, o el medioambiente es muy favorable para el desarrollo de la enfermedad. En la PC crónica, la enfermedad no se propaga con rapidez al cogollo, pero el meristema apical cesa de producir nuevas hojas diferenciadas, a pesar de que el meristema apical físicamente no está descompuesto. Esto provoca un descenso lento y la muerte económica de la palma, pues la misma deja de producir. Finalmente, en la PC de recuperación, la enfermedad se desarrolla similar a la PC crónica; excepto que la división celular en el meristema apical no se inhibe permanentemente, lo cual permite la producción de nuevas hojas y flores. Las nuevas hojas y flores a menudo son deformes, pero surgen otras hojas normales en apariencia y la palma empieza a producir frutos nuevamente. Las palmas afectadas se recuperan (desarrollo de inmunidad) (Elliott, 2009).

### **2.3.2.2 Epifitiología de la PC**

Durante décadas (desde los años veinte al menos), se han hecho esfuerzos para tratar de asociar las pudriciones del cogollo con la acción de diversos organismos potencialmente patogénicos que se han encontrado (o no) en el tejido enfermo. Para controlar este agente fitopatógeno se han aplicado varios tipos de producto sobre las plantas afectadas, incluso compuestos con acción contra fitoplasmas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, sin lograr un control efectivo.

Todos los organismos aislados del tejido infectado, comparten algunas características como: 1) todos son patógenos débiles, oportunistas y presentes en casi cualquier ecosistema, 2) solo prosperan en tejidos previamente debilitados por algún tipo de estrés y 3) atacan tejidos en activo crecimiento. Estos organismos están también presentes en los llamados 'declines', que afectan varias especies forestales y otros cultivos. *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Thielaviopsis* spp., y *Erwinia* spp., son algunos ejemplos de los microorganismos que se encuentran asociados (Corley y Tinker, 2003b).

La relación entre incidencia de la PC y las variedades de *E. guineensis*, no siempre ha sido clara. En la historia de la PC en América tropical hay ejemplos de brotes devastadores en varios países y regiones en donde se habían plantado materiales genéticos de diferentes orígenes. Existe evidencia de que los progenitores maternos de Deli son susceptibles, y que una de las variedades más populares, Deli x Avros, puede ser severamente afectada. Hasta el momento todas las variedades comerciales 'guineensis' son susceptibles, pero algunas presentan tolerancia, caracterizada por una combinación de las características siguientes: 1) el desorden aparece más tardíamente después del trasplante en el campo, 2) la tasa de incremento del problema en el tiempo es menor, 3) los síntomas son menos severos, 4) la recuperación de los síntomas es más rápida, 5) hay menor incidencia final, 6) los efectos sobre el rendimiento son menores. Estas características parecen estar presentes en algunas poblaciones originadas en Bamenda, Tanzania, Mobai, Enthebe, Malawi y La Mé entre otras (Chinchilla, 2010).

Por otro lado, la especie *E. oleifera* es una fuente importante de tolerancia a las pudriciones del cogollo, y esta característica puede ser combinada con los genes de *E. guineensis* para

obtener los híbridos O x G, que han sido plantados en sitios previamente afectados por la PC con un grado variable de éxito.

Las pudriciones del cogollo, en general se asocian con factores que afectan en forma negativa el desarrollo radical (formación de nuevas raíces y deterioro de las ya formadas), y la capacidad de la planta de defenderse de patógenos oportunistas (balance energético alterado). Estos son los factores de predisposición, tales como una mala aireación de los suelos, un período de sequía prolongado, una alta carga de racimos (en particular en una situación posterior desfavorable para la fotosíntesis), y una nutrición desequilibrada. El efecto negativo de una sequía sobre el sistema radical es acentuado en suelos con una baja capacidad de retención de humedad y bajos contenidos de potasio. En general, cualquier factor que afecte en forma negativa la formación y longevidad del sistema radical, y el balance energético de la planta, podría predisponerla a un ataque (Chinchilla y Duran, 1999).

Desde el punto de vista nutricional, la PC tiende a alcanzar mayores incidencias en suelos con bajos contenidos de potasio y fósforo, o donde existen desequilibrios entre las bases (Mg, Ca y K). Una combinación potencialmente perjudicial, podría ser el uso de cantidades excesivas de nitrógeno, donde el potasio está en condiciones de deficiencia (o desequilibrio con las otras bases), y que además se presente un déficit hídrico severo en un suelo con baja capacidad de retención de humedad, seguido de anegamiento del suelo por altas precipitaciones y baja radiación solar.

Después que aparece la enfermedad, ésta progresa linealmente durante algunos años y luego se inicia la fase exponencial. En la amazonía ecuatoriana la fase lineal como promedio dura 12 años con una tasa de plantas afectadas del 1 % por año. Los casos se diseminan al azar y luego se observa la formación de focos los cuales se unen con rapidez creciente. La curva de progresión de la enfermedad al inicio es lineal y luego le sigue la fase exponencial cuando las pérdidas acumuladas alcanzan un 12-15 % (De Franqueville, 2003).

A su vez, van de Lande (1993) realizó un estudio epifitiológico de la pudrición de la flecha en palma de aceite durante 10 años en Surinam. Este autor concluyó que: a) existieron dos modelos de dispersión que explicaron la dinámica de la enfermedad en campo, b) que las fuentes de inóculos provenían de fuera de la plantación, c) que la enfermedad puede

transmitirse por vectores, d) que la enfermedad aumentó de manera logística y que la dispersión de la enfermedad estuvo influenciada por el viento. Este autor recomendó que las plantaciones deben abandonarse cuando se afecte el 40 % de las plantas de palma de aceite.

#### **2.4 Caracterización de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite**

Existen registros de patógenos asociados con la PC desde 1928, cuando Reinking, citado por Richardson (1995), descubrió la existencia de bacterias, hongos de los géneros *Fusarium* y *Phytophthora*.

En plantaciones de palma de aceite de las zonas Occidental y Central de Colombia, se estudiaron algunos hongos asociados con la PC como: *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Nigrospora* sp. Para el caso de bacterias, las más frecuentes fueron *Erwinia* sp. y *Pseudomonas* sp. Asimismo, aislaron algunos representantes del reino Straminipila (*Phytophthora* sp. y *Pythium* sp.) (Martínez *et al.*, 2008 b).

En Ecuador, en la plantación Palmeras del Ecuador (PDE) se estudió la microflora asociada con síntomas de PC en la palma de aceite, y se encontraron principalmente hongos de los géneros: *Phoma*, *Cephalosporium*, *Pyrenochaeta*, *Pestalotia* y *Colletotrichum* (Renard, 1991).

Santos (2010), relató que los primeros registros de un patógeno asociado con la PC datan de 1962. A partir de estas investigaciones, se formularon varias hipótesis sobre las posibles causas, entre las cuales se destacaron: causas asociadas con desórdenes fisiológicos o nutricionales de las plantas (abióticas), y causas asociadas con el ataque de hongos, virus y bacterias (bióticas).

Laing (2009), mencionó que la PC es una enfermedad atribuible a deficiencias nutricionales (calcio específicamente). Este autor sugirió que una vez que las plantas estuvieron debilitadas, a consecuencia de esta deficiencia, se predisponen al ataque de microorganismos

patógenos débiles, presentes en la microflora de los cultivos tropicales y subtropicales, asociados con la palma de aceite.

Según Martínez *et al.* (2008 a), la PC es una enfermedad de origen biótico causada por el patógeno *P. palmivora*. A este microorganismo se le considera el iniciador del proceso infeccioso.

En el año 1996 se llevó a cabo una reunión con investigadores, cultivadores y procesadores de palma de aceite, con el fin de conocer las investigaciones sobre el manejo y control de la PC. CENIPALMA, informó la existencia de diferentes microorganismos, los cuales fueron aislados a partir de muestras con síntomas de PC (Santos, 2010).

Se identificaron representantes de los géneros *Pythium*, *Fusarium* y *Thielaviopsis* sp. *Pythium* y *Fusarium*, asociados con daños en la flecha, sin la existencia de un mal olor. Por otra parte, *Thielaviopsis* se asoció con muestras de tejidos con mal olor, muy similar al de plantas naturalmente afectadas (Santos, 2010).

Según Bachy (1954) en Sibiti (Congo Belga) encontraron una fuerte asociación entre la PC y la presencia de bacterias, así como hongos del género *Fusarium*, principalmente *F. oxysporum* Klotz (Schlecht), *F. solani* y *F. roseum*.

Años después, Duff (1963) aisló de los tejidos enfermos una bacteria del género *Erwinia* (similar a *E. herbicola*), con la cual obtuvo los síntomas de la pudrición en plantas jóvenes de palma de aceite, después de haber inducido un estrés fisiológico que provocó un retardo en el crecimiento (De Franqueville, 2001).

Nieto *et al.* (1996), informaron que las pruebas realizadas por varios investigadores no han logrado reproducir la enfermedad porque no se han utilizado métodos de inoculación adecuados, a pesar de que siempre se aíslan prácticamente los mismos patógenos.

Perthuis (1990), indicó que el agente causal puede ser un virus o un micoplasma transmitido por un insecto vector. En Ecuador se ha podido registrar a *Fusarium* spp., y *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes), como causantes de la enfermedad.

En Colombia, se han informado a *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* (Wollenw & Reinking), *F. solani* y *Thielaviopsis* sp. (Nieto, 1993) como microorganismos asociados con la PC.

Relacionado con la PC está *R. palmarum*, que causa un daño directo a la palma de aceite, y puede provocar la muerte de las plantas. Este insecto, provoca daño cuando se encuentra en estado larval y se alimenta de las bases peciolares de la zona del cogollo. En estado adulto este coleóptero es fuertemente atraído por el olor de palmas afectadas con PC, ya que es un sitio óptimo para garantizar su reproducción. En estados avanzados de pudrición, la reproducción de *R. palmarum* impide la recuperación de la palma ya que ataca el meristema y así causa la muerte de la planta (Aldana *et al.*, 2011).

#### **2.4.1 *Erwinia* spp**

En la zonas de Shushufindi y Huashito en 1995 (Allen *et al.*, 1998) encontraron analogías entre la PC y el fuego bacteriano de la pera y la manzana, causado por *Erwinia amylovora* (Burril). Estos autores sugirieron que las dos enfermedades tenían en común una dispersión que era visiblemente aérea, asociada con abejas, en el caso del fuego bacteriano (De Franqueville, 2001).

Otros autores sugieren la presencia de una bacteria del género *Erwinia* que puede ser aislada de los tejidos tiernos en proceso de desarrollo y en los cogollos, y que las dos enfermedades eran influenciadas por los factores ambientales y el manejo cultural. Además, proponen que un aislado poco agresivo proveniente de un área silvestre, pudo ganar agresividad durante infecciones sucesivas, hasta adquirir mayor virulencia. *Erwinia* puede tener un hábitat en el suelo, o conservarse en los restos vegetales, y cuando es altamente agresiva, podría provocar daños en el replantío (De Franqueville, 2001).

Como en el caso del fuego bacteriano, la bacteria puede producir toxinas (amylovorina). La enfermedad se desarrolla con dificultad en los árboles frutales, porque es necesario que existan condiciones climáticas favorables, condiciones fisiológicas de las plantas, y las poblaciones de vectores para que haya expresión de los síntomas (De Franqueville, 2001).

En Ecuador Dollet (1991) informó la presencia de bacterias del género *Erwinia* (*E. herbicola* y *Erwinia* spp.), así como del género *Pseudomonas*, aisladas a partir de muestras de tejidos con síntomas de PC, las cuales no reprodujeron síntomas en ensayos de inoculación artificial en plantaciones de Ecuador, así como en invernaderos en Montpellier, Francia.

*Erwinia* como representante de la familia *Enterobacteriaceae* está ampliamente distribuido en la naturaleza. Varias especies de esta familia son de vida libre en numerosos nichos ecológicos, tanto en ambientes terrestres como acuáticos. Otros están asociados solamente con plantas, animales e insectos. Son de gran significado en la salud humana, animal y de las plantas, por lo que tienen numerosas aplicaciones en la agricultura como agentes biocontroladores, producción de proteínas recombinantes, control de enfermedades infecciosas, producción de agentes anticancerígenos, reciclaje de desechos y en la biorremediación (Octavia y Lan, 2014).

#### **2.4.1.1 Clasificación taxonómica**

El género *Erwinia* ha estado sujeto a diversas propuestas de clasificación (Schaad *et al.*, 2001). *Erwinia* puede dividirse en cuatro grupos: amylovora (causante de marchitamientos no pectolíticos), carotovora (pudriciones blandas pectolíticas), herbícola (producen pigmento amarillo), y el grupo de *Erwinia* atípicas (Dye, 1981; Schaad *et al.*, 2001).

#### **2.4.1.2 Características morfológicas**

*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey, las colonias desarrolladas en medio de cultivo Agar Nutriente son de forma circular, borde liso, superficie convexa, color blanco cremoso, crecimiento abundante y reflectancia a la luz oblicua. Presenta tinción Gram negativa y flagelos peritricos. No crecen a 37 °C, el metabolismo de la glucosa se caracteriza por ser oxidativo fermentativo, sin formar precipitado ya que no forma compuestos reductores a partir de la sacarosa. Las cepas son positivas a la prueba de degradación de pectatos (Schaad *et al.*, 2001).

#### **2.4.2 El género *Fusarium***

El género *Fusarium* contiene varias especies que son saprófitos comunes del suelo así como fitopatógenos y producen una amplia diversidad de metabolitos secundarios que pueden ocasionar daños en plantas, animales y en humanos. Dentro de los principales metabolitos conocidos de *Fusarium*, se destacan: toxinas (micotoxinas y fitotoxinas), pigmentos, antibióticos, esteroides, giberelinas, compuestos alifáticos, carotenoides, enzimas y compuestos nitrogenados simples.

Las fitotoxinas de *Fusarium* pueden tener una gran importancia como factores de virulencia en numerosas especies. En relación con su importancia agrícola encontramos: trichothecenes (un grupo diverso de toxinas tipo sesquiterpenoides con una fuerte actividad inhibidora de la síntesis de proteínas en las plantas) (Langevin *et al.*, 2004), ácido fusárico y ácido dehidrofusárico (inhibidores del crecimiento vegetal) (Bacon *et al.*, 1996), enniantinas (Logrieco *et al.*, 1992), licomarasminas (Vesonder y Hesseltine, 1983), ácido picolínico (Vesonder y Hesseltine, 1983), fusaproliferinas (Shephard *et al.*, 1999) y beauvericinas (Logrieco *et al.*, 1998a), entre otras.

*F. oxysporum* produce moniliforminas (Marasas *et al.*, 1979; Abbas *et al.*, 1989b, 1991; Mirocha *et al.*, 1989a; Chelkowski *et al.*, 1990) y zearalenonas (Per, 1995; Pitt y Hocking, 2009). *F. oxysporum* no produce trichothecene (Tan y Niessen, 2003). Abbas y Mirocha (1988) aseguraron que *F. oxysporum* produce wortmannina. Por otra parte, *F. solani* produce ácido fusárico (Bacon *et al.*, 1996) y ciclosporina (Sugiura *et al.*, 1999). *F. subglutinans* (Wollenw & Reinking) Nelson, Tousson & Marasas produce pocas o casi ninguna fumonisinas, pero sí produce moniliforminas, beauvericinas, ácido fusárico, y elevados niveles de fusaproliferina. *F. subglutinans* no produce trichothecene.

*F. proliferatum* es una de las especies de mayor producción de fumonisinas. Asimismo, esta especie produce ácido giberélico, beauvericina, fusaproliferina, ácido fusárico, fusarinas y moniliforminas. Finalmente, *F. semitectum* (Desjardins, 2006) produce zearalenonas (Leslie y Summerell, 2006), toxina T-2, diacetoxyscirpenol, diacetoxyscirpenol nivalenol, fusarenona-X y neosolaniol (Suzuki *et al.*, 1981).

Existen diversos trabajos en los que se estudió el posible agente causal de la PC. Bachy (1954), citado por Martínez *et al.* (2008 a), encontró una asociación con *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. roseum* (Link), pero la inoculación artificial de estos hongos no tuvo resultados definitivos sobre el agente causal de la enfermedad.

Renard (citado por De Franqueville, 2001, 2003) realizó aislamientos de palmas afectadas con PC, que mostraron el predominio de cepas de *Fusarium* (*F. oxysporum* y *F. solani*) y bacterias en el tejido afectado; sin embargo, las pruebas de inoculación no reprodujeron los síntomas de la enfermedad.

El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador, informó que *F. solani* ha sido frecuentemente aislado a partir de plantas afectadas con PC (INIAP, 2011).

#### **2.4.2.1 Clasificación taxonómica**

Según Crous *et al.* (2004), *Fusarium* es un microorganismo perteneciente:

Dominio: Eucariota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordaryomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

##### **2.4.2.1.1 Características culturales**

En varios estudios se evalúan las siguientes características de las colonias de *Fusarium* spp: morfología de las colonias, la textura, el color del anverso y del reverso de las colonias, la pigmentación y velocidad de crecimiento en PDA. Para obtener resultados confiables y repetibles se requiere una rigurosa y cuidadosa preparación del medio de cultivo.

Para evaluar las características culturales se deben preparar inóculos e incubarlos mediante el uso de procedimientos estandarizados. En ocasiones las características culturales pueden usarse con bastante éxito como criterio en la clasificación de algunas especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

Las colonias de *F. oxysporum* crecidas sobre PDA son altamente variables, pueden producir pigmentaciones sobre agar desde incoloras, violeta pálido, violeta oscuro o magenta oscuro. Algunos aislados pueden producir esclerocios azules o azules-negros. La textura puede ser flocosa, esparcida, en algunas ocasiones pueden mutar hacia colonias pionnotales o con la presencia húmeda del micelio el cual crece muy pegado al agar. El anverso de las colonias varía desde el anaranjado hasta el violeta.

Las colonias de *F. proliferatum* sobre PDA son altamente variables con pigmentaciones que varían desde: incoloras, violeta pálido, violeta gris, gris anaranjado, violeta oscuro y magenta oscuro. El micelio sobre este medio crece abundantemente al inicio y es de color blanco, pero a medida que envejece el cultivo se torna violeta púrpura.

Las colonias de *F. semitectum* sobre PDA producen abundante micelio de aspecto denso, al inicio es blanco y luego con la edad de los cultivos cambia a beige o carmelita. Otras muestran colores carmelita pálido a pardo grasiento por el reverso.

Las colonias de *F. solani* sobre PDA producen pigmentaciones variables sobre el agar, desde incoloras a blanco-crema, blanquecinos, violetas, carmelita pálido, grisáceas a ligeramente azuladas. La textura de las colonias generalmente es escaso o dispersa, constituida por micelio de color blanco cremoso.

Las colonias de *F. subglutinans* crecidas en PDA presentan pigmentaciones sobre el agar variables, desde incoloras, violeta pálido, violeta gris, gris violeta, violeta, violeta oscuro, magenta oscuro, púrpura claro a casi negro. En este medio se produce abundante micelio blanco al inicio y luego se convierte en violeta a medida que envejece el cultivo.

#### **2.4.2.1.2 Características morfológicas**

Las especies de *Fusarium* son variables en su composición genética y en su respuesta adaptativa al medioambiente, que puede causar cambios morfológicos. La base en la identificación de especies de *Fusarium* son los macroconidios (Toussoun *et al.*, 1983). Los macroconidios tienen forma de media luna o canoa y constan de una célula apical y una célula basal. Hay cuatro formas de células apicales: obtusa, papilada, gancho y elongada. La célula basal tiene cuatro formas: de pie, pie elongado, en forma de muesca y apenas muescado. La célula basal es la menos curvada de todas las células en los conidios, si esta es curvada el resto también. Los caracteres más importantes son los relacionados con la longitud y la forma de la célula (Leslie y Summerell, 2006).

No todas las especies de *Fusarium* producen microconidios, sin embargo esta es una característica importante. Son producidos en el micelio aéreo, nunca en esporodocios (Toussoun *et al.*, 1983). Las células conidiogénicas en las cuales se forman, y su disposición alrededor de ellas son aspectos utilizados para el diagnóstico. Por lo general, tienen de 0 o 1 septo, algunas especies tienen dos septos, pueden ser de forma oval, reniforme, truncada, piriforme, globosa, napiforme, esférica y fusiforme (Leslie y Summerell, 2006).

Las clamidosporas son estructuras morfológicas importantes en la clasificación de especies de *Fusarium*. Las clamidosporas pueden estar formadas solas, en parejas, en grupo o en cadenas. Estas estructuras se forman en aproximadamente seis semanas y pueden producirse en poca cantidad. Se encuentran en micelio aéreo o embebidas en el agar; la ubicación es importante en la identificación de especies (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.5 Principales regiones del ADN utilizadas en el diagnóstico molecular de hongos fitopatógenos**

#### **2.5.1 Espaciadores transcriptos internos (ITS)**

Estos marcadores se refieren particularmente a dos secuencias no funcionales de ADN<sub>r</sub>, intercaladas entre los genes ribosómicos, las que se presentan consecutivamente en múltiples copias, que pueden ir desde cientos a miles en un arreglo en grupo y que codifican proteínas

idénticas o casi idénticas. White *et al.* (1990) diseñaron y describieron iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADNr mitocondrial y nuclear en hongos, lo que brinda la posibilidad de realizar estudios filogenéticos con estos genes (Schoch *et al.*, 2012).

La región ITS completa abarca 600 a 800 pares de base (pb); la misma puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales. La naturaleza multicopia de las repeticiones del ADNr hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aun cuando se utilizan muestras pequeñas de ADN. Esto lo convierte en uno de los marcadores más usados para llevar a cabo inferencia filogenética a nivel genérico e intra genérico (Schoch *et al.*, 2012).

Entre las ventajas de los ITS, se destaca su herencia bi-paterna, la cual permite revelar casos de reticulación, hibridación y poliploidia. Asimismo su universalidad, amplia disponibilidad de iniciadores para su amplificación y su relativa abundancia, fácil aislamiento y su amplia variabilidad entre genomas diferentes, convierten a esta región en un excelente marcador para realizar inferencia genética en diferentes niveles taxonómicos, desde especie hasta familia.

### **2.5.2 Factor de elongación de la traducción eucariótica 1- $\alpha$ TEF**

El Factor de elongación de la traducción eucariótica 1- $\alpha$  TEF, es un gen que codifica una proteína altamente conservada, que posee un importante papel en el ciclo de elongación y síntesis de la proteína en las células eucariotas. En eucariotas, el 1- $\alpha$  TEF es la segunda proteína más abundante después de la actina; la cual constituye del 1 al 2 % del total de proteínas en el crecimiento normal de la célula (Condeelis, 1995).

Las bandas cargadas de moléculas de Ácido ribonucleico total (ARNt), transportan hacia los sitios receptores de los ribosomas adyacentes a una cadena polipeptídica en crecimiento. El gen 1- $\alpha$  TEF, puede presentarse en múltiples copias en algunos *Ascomycota* y *Zygomycota*; una de las ventajas que presenta el uso del gen que amplifica para el 1- $\alpha$  TEF es su capacidad para resolver relaciones filogenéticas a nivel de especie, así como las divergencias más profundas en los hongos.

La región del gen 1- $\alpha$  TEF que codifica para la traducción del factor de elongación de la traducción eucariótica 1- $\alpha$  TEF, ha incluido el uso de diferentes oligos, aunque los más utilizados con mayor frecuencia son EF1 y EF2.

### **2.5.3 Identificación de especies de *Fusarium* mediante técnicas moleculares**

Las aplicaciones actuales de las tecnologías disponibles para la identificación de especies del género *Fusarium* basadas en técnicas moleculares, utilizan regiones del ADN de gran importancia para el diagnóstico.

Las regiones ITS e IGS son secuenciadas en numerosas especies del género *Fusarium*, para compararlas sobre la base del porcentaje de homología (Mishra *et al.*, 2003; Gagkaeva y Yli-Mattila, 2004; Konstantinova y Yli-Mattila, 2004; Mirete *et al.*, 2004; Yli-Mattila *et al.*, 2004).

El uso de la información de diferentes regiones genómicas y de secuencias de diferentes genes, les permite a los taxónomos moleculares identificar con mayor precisión a especies fúngicas tanto a nivel individual como poblacional.

El análisis de la región 1- $\alpha$  TEF, ha sido muy utilizado para el diagnóstico de especies del género *Fusarium*. Por ejemplo, Gurjar *et al.* (2009) utilizaron las secuencias de ésta región para identificar a *Fusarium proliferatum* Matsushima (Nirenberg) y *F. oxysporum*, como dos especies asociadas con la marchitez del garbanzo en la India.

Por otra parte, Lievens *et al.* (2007) desarrollaron la técnica de RAPD correspondientes a la región 1- $\alpha$  TEF y distinguieron a *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* y *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* en infecciones mixtas en pepino. Asimismo, Nicolaisen *et al.* (2009) utilizaron pruebas de PCR para diferenciar a especies toxigénicas y no toxigénicas del género *Fusarium*, al analizar la misma región, mientras Kristensen *et al.* (2007) usaron un ensayo cuantitativo basado en microarreglos del ADN correspondientes con el gen 1- $\alpha$  TEF para identificar 15 especies de *Fusarium* productoras de tricotecenas y moniliformina.

Otros autores han utilizado de modo conjunto las secuencias correspondientes al gen 1 $\alpha$ -TEF así como los genes mitocondriales y del ADNr para clasificar especies del género *Fusarium*, las cuales no habían sido identificadas anteriormente mediante informaciones de una sola región (Baayen *et al.*, 2000; Skovgaard *et al.*, 2001). Esta estrategia de utilizar varias regiones, le permitió a Gurjar *et al.* (2009) analizar filogénicamente mediante la región TEF-1 $\alpha$  a cuatro razas de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, lo cual confirmó que la raza 3 de este patógeno en realidad se trataba de *Fusarium proliferatum* y no de *F. oxysporum* como había sido considerada anteriormente.

En la clasificación molecular de especies del género *Fusarium*, se dedican importantes esfuerzos al desarrollo de marcadores moleculares para desarrollar un código de barra, mediante el uso de secuencias del ADN de diferentes regiones genómicas; entre las cuales la región 1- $\alpha$  TEF ha sido utilizada exitosamente (Geiser *et al.* 2004).

Asimismo, otras regiones han sido utilizadas, como: ADN mitocondrial (Láday *et al.*, 2004), la  $\beta$ -tubulina (Gagkaeva y Yli-Mattila, 2004; Mach *et al.*, 2004; Yli-Mattila *et al.*, 2004b), factor de elongación y traslado eucariótico 1- $\alpha$  TEF (Knutsen and Holst-Jensen, 2004), y la calmodulina (Mulé *et al.*, 2004). Todas ellas han sido exitosamente usadas para identificar especies del género *Fusarium*.

Sin embargo, otros autores utilizan genes relacionados con la biosíntesis de micotoxinas para el diagnóstico de especies del género *Fusarium* (Niessen y Vogel 1998; Lee *et al.*, 2001; González-Jaen *et al.*, 2004; Nicholson *et al.*, 2004; Bezuidenhout *et al.*, 2006; Baird *et al.*, 2008), asimismo con esta región se puede distinguir entre especies productoras y no productoras de micotoxinas, lo cual es de gran valor en la evaluación de la inocuidad de numerosos productos alimentarios para el consumo humano y animal.

El uso de la información de diferentes regiones y secuencias de genes, les permite a los taxónomos moleculares determinar con mayor precisión no solo a una especie en particular, sino también caracterizar poblaciones de especies mediante el uso de técnicas cualitativas y cuantitativas.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Las actividades investigativas se realizaron en: laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Politécnica Superior del Chimborazo (ESPOCH), el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, laboratorio de Genómica Funcional de plantas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana (CIGB), el laboratorio del Servicio Ecuatoriano de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), Ecuador y el laboratorio de Fitopatología y Entomología de la Universidad de Estudios de Sassari, en Italia.

#### **Recolección de muestras de palmas**

En el mes de octubre de 2012 se realizó una primera colección de muestras de tejidos afectados en las plantaciones de las empresas: Palesema, Palmeras de Los Andes, Palpailon, Alespalma y Energy & Palma. Además, se colectaron plantas enfermas en vivero del híbrido Coarí x La Mé y *E. guineensis*, de las empresas Palmeras de Los Andes y Alespalma, las cuales fueron trasladadas al laboratorio de Sanidad Vegetal de la Escuela Politécnica Superior del Chimborazo (ESPOCH), para su posterior análisis.

En el mes de diciembre del mismo año, se efectuó una segunda recolección de tejidos de plantas enfermas en las empresas: Palesema, Palmeras de Los Andes, Palpailon y Energy & Palma. Las palmas seleccionadas fueron cortadas en la base del tallo, luego se retiraron todas las hojas y se dejó el paquete central de flechas; se realizó un nuevo corte transversal a la altura del último racimo de fruta y posteriormente se practicó un corte longitudinal en esta sección superior de la planta. Se recolectó material de tejido sano y enfermo de cogollos, flechas y raíces. Los materiales colectados se colocaron en bolsas de papel con su debida identificación, para ser trasladados al laboratorio de Sanidad Vegetal de la ESPOCH.

#### **Registro de síntomas de plantas enfermas**

Se registraron las manifestaciones sintomatológicas externas e internas de las plantas atacadas por la PC a nivel de hojas, flechas, cogollo, zona del meristema y raíces.

### **Aislamiento de las muestras con la PC**

El aislamiento de las muestras de tejido enfermo de la primera colección se realizó en el laboratorio de la empresa Alespalma. En el laboratorio de Sanidad Vegetal de la ESPOCH, se realizó el aislamiento de los organismos asociados de las plantas enfermas de vivero del material híbrido Coarí x La Mé y *E. guineensis*, así como de las muestras de tejidos afectados de la segunda colección en las plantaciones comerciales de las empresas palmicultoras seleccionadas (figura 1).



**Figura 1.** Muestras de plantas de palma de aceite de vivero de 6 meses de edad (a y b) y de campo con síntomas de clorosis alrededor de la flecha (a y c). Necrosis y pudrición descendente de flecha y cogollo (b y d). Necrosis a nivel de raíz y base de raíz (e y f).

En el laboratorio se cortaron secciones pequeñas de muestras de tejidos enfermos, las cuales se lavaron en agua corriente por 15 min; luego se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 min. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. Bajo la cámara de flujo laminar las secciones de las muestras en estudio se secaron en papel filtro estéril, y se les practicaron cortes pequeños, de 5 a 8 mm. Los fragmentos de tejidos obtenidos se sembraron inicialmente en el medio de cultivo estéril Agar Agua al

2 %, para promover el desarrollo microbiano, se incubaron las placas de Petri a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ . La flora fúngica y bacteriana presente se transfirió a placas de Petri (90 mm Ø), que contenían Papa Dextrosa Agar (PDA, Fluka ®) al 3,8 % y Agar Nutriente al 2,8 % respectivamente. Las placas fueron incubadas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

Posteriormente se hicieron reislamientos de los agentes microbianos fúngicos y bacterianos para obtener cultivos puros, acorde con lo referido por Dhingra *et al.* (1995), Benson (1998) y Agrios (2005). Los cultivos puros fueron registrados y almacenados en placas de Petri debidamente selladas y conservadas en gabinetes a temperatura ambiente.

### **Procesamiento estadístico de los datos**

El procesamiento estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 21.0 para Windows.

### **3.1 Caracterización sintomatológica y determinación de la incidencia e intensidad de ataque de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en San Lorenzo**

Para evaluar la sintomatología de la PC se estableció una escala de severidad sobre la base de los síntomas observados; se asignó la valoración en la escala según el porcentaje de daño existente en el momento del estudio. Esto se realizó en el cantón San Lorenzo, en cinco empresas Palmeras (Palesema, PDA, Palpailón, Energy & Palma y Alespalma).

En el año 2013 se evaluaron plantas de *E. guineensis* (con edades de 11 y 5 años, respectivamente) y plantas de 5 y 2 años del híbrido interespecífico Coarí x La Mé, respectivamente (tabla 1).

Se seleccionaron plantas sanas y enfermas, correspondientes a los materiales *E. guineensis* y el híbrido interespecífico Coarí x La Mé, y se tomó en consideración la edad de los materiales; en total se evaluaron 188 plantas, en un período de 2 meses (agosto-septiembre, 2013).

**Tabla 1.** Número de plantas evaluadas por empresa en la caracterización de la sintomatología de la enfermedad pudrición del cogollo.

Empresa	<i>E. guineensis</i>		Híbrido Coarí x La Mé	
	Plantación	Plantación	Plantación	Plantación
	2002	2008	2008	2011
Alespalma	14	13	0	0
Energy & Palma	14	15	3	2
Palmeras de Los Andes	12	12	8	6
Palesema	12	14	10	10
Palpailón	16	15	6	6
Total	68	69	27	24

Las palmas seleccionadas fueron cortadas con una motosierra (STHIL, Modelo 051AVE) por la base del tallo a 50 cm del suelo aproximadamente. Se retiraron las hojas, y se dejaron libres el estipe y el paquete de flechas. La evaluación interna se realizó mediante el corte transversal y longitudinal del estipe (figura 2) a la altura del último racimo (sección superior).



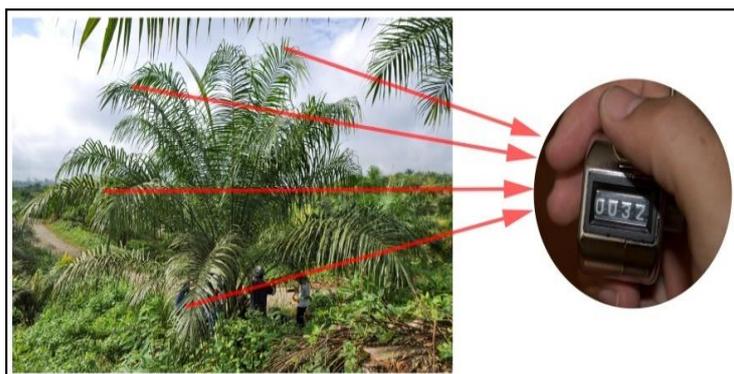
**Figura 2.** Corte de las palmas seleccionadas. Corte en la base del tallo (a), corte transversal a la altura del último fruto (b); corte longitudinal en la sección superior (c).

De las plantas seleccionadas se midió la longitud desde la base de la planta hasta el ápice del último fruto, y luego se midió la longitud desde la base de la planta hasta el meristema (figura 3).



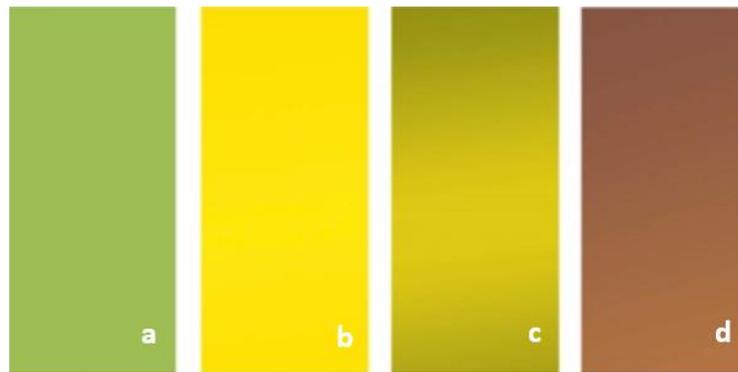
**Figura 3.** Medición de las alturas ( $m$ ) de las plantas seleccionadas. Longitud ( $m$ ) desde la base de la planta hasta el último racimo (a); longitud ( $m$ ) desde la base de la planta hasta el meristema (b).

Se contabilizó el número total de hojas de cada planta seleccionada, mediante un contador manual (figura 4).



**Figura 4.** Conteo del número total de hojas de cada planta de palma de aceite seleccionada en San Lorenzo.

Para la evaluación de las hojas cloróticas, amarillas, cloróticas amarillas y necróticas se elaboró una escala de tonalidades (figura 5). De cada planta seleccionada, se contabilizó el número de hojas afectadas alrededor del cogollo (figura 6).



**Figura 5.** Escala de tonalidades elaborada para la evaluación de los síntomas en hojas afectadas. Hoja clorótica (a); hoja amarilla (b); hoja clorótica amarilla (c); hoja necrótica (d).



**Figura 6.** Conteo del número de hojas afectadas alrededor del paquete de flechas aún no abierto (cogollo). Hojas cloróticas (a); hojas amarillas (b); hojas cloróticas amarillas (c); hojas necróticas (d).

En las plantas seleccionadas se marcaron las hojas 1, 2, 9, 10, 17, 18, 25, 26 y las hojas restantes se eliminaron luego se midió el ángulo de las hojas marcadas con la ayuda de una escuadra: primero se colocó el nivel de burbuja en el lado horizontal de la escuadra y se estacionó ésta (a nivel) en la axila de la hoja que topa con el estipe de la planta, luego se midió el lado horizontal desde el ángulo de  $90^\circ$  hasta el raquis de la hoja, y el lado vertical desde el ángulo de  $90^\circ$  hasta la axila de la hoja (catetos) (figura 7). Finalmente con la ayuda de una fórmula trigonométrica se calculó el ángulo de las hojas.



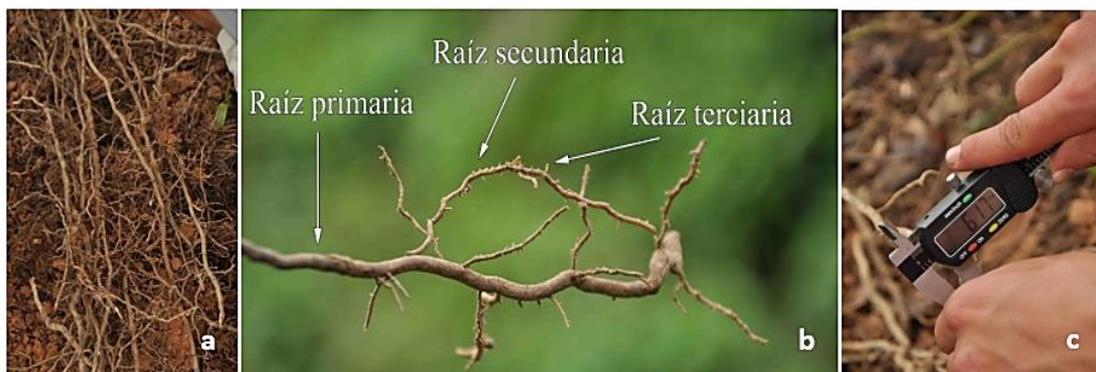
**Figura 7.** Medición de los ángulos de las hojas. Marcado de las hojas 1, 2, 9, 10, 17, 18, 25 y 26 (a); eliminación de las hojas restantes (b); hojas libres para la evaluación (c); medición de los catetos (d).

De las plantas seleccionadas, se midió la longitud del paquete de flecha. Para determinar la longitud del ataque, primero se midieron las tres flechas que componían la parte externa del paquete, y luego las tres flechas restantes que formaron la parte interna del paquete (figura 8 a). El avance descendente de las plantas seleccionadas se midió desde el meristema hasta donde llegó el ataque (figura 8 b).



**Figura 8.** Medición de la longitud (m) del paquete de flecha y del ataque desde el meristema. Longitud de la flecha (a); longitud del ataque (b).

Con la ayuda del calibrador digital se midieron las raíces primarias, secundarias y terciarias (10 raíces de cada una) de las plantas seleccionadas (figura 9).



**Figura 9.** Medición del diámetro (*mm*) de las raíces. Colecta de diez raíces (a); raíces primarias, secundarias y terciarias (b); medición del diámetro de las raíces (c).

La medición del ataque descendente se realizó acorde con lo ilustrado en la figura 10.



**Figura 10.** Medición del avance descendente (m) de la pudrición del cogollo. Medición del ataque desde el meristema hacia arriba (a); medición del ataque desde el meristema hacia abajo (b).

Para realizar el cálculo de la incidencia e intensidad de ataque de la PC en San Lorenzo, se realizaron muestreos en las empresas: PDA, Palpailon, Palesema y Alespalma. En cada empresa se muestrearon 5 lotes, y en cada lote se seleccionaron 10 muestras, compuestas cada una por 10 plantas. Por cada empresa se muestreó un total de 500 plantas. Para seleccionar las muestras dentro de cada lote, se siguió el método de muestreo aleatorio simple en forma de zig-zag, las plantas se seleccionaron aleatoriamente cada 10 hileras.

Mediante la aplicación de la fórmula planteada por la Sociedad Inglesa de Micología, se realizó la evaluación de la incidencia de la PC en el material *E. guineensis*.

$$I (\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de plantas afectadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de plantas}} \times 100$$

Además, con las incidencias acumuladas del material *E. guineensis*, correspondiente a los años 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, y 2013, se generó un modelo polinomial para estimar la incidencia acumulada para el año 2014.

La evaluación de la intensidad de ataque de la PC se realizó en el material *E. guineensis* y se procedió de modo similar a lo realizado para el cálculo de la incidencia, solo que para calcular esta variable se utilizó la fórmula planteada por Townsend y Heuberger (1943). En cada lote se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras, compuestas cada una por 10 plantas cada una y se calculó la intensidad de ataque.

$$IA(\%) = \frac{\Sigma(n \times v)}{G \times N} \times 100$$

I = Intensidad del Ataque

n = Número de plantas por grado de la escala

v = Grado de ataque según la escala

G = Número total de grados

N = Número total de plantas observadas

### **3.2 Identificación sobre la base de caracteres culturales, morfológicos, bioquímicos y moleculares de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite**

#### **3.2.1 Caracterización de los hongos asociados**

Previa a la caracterización, se realizó el aislamiento de los hongos asociados mediante cultivos monospóricos, según los criterios de Balmas *et al.* (2000). Se tomó una pequeña porción de micelio con esporas de las placas de Petri (90 mm Ø) con medio PDA y se suspendió en un tubo de ensayo estéril que contenía 10 mL de agua destilada estéril.

Después de una agitación manual, la suspensión conidial se vertió en placas de Petri (90 mm Ø) con Agar Agua 2 %, e inmediatamente se eliminó el exceso de agua de las placas por decantación.

Posteriormente las placas fueron colocadas en posición vertical y se incubaron a 25 °C, en oscuridad durante 24 h. Con un estereoscopio (Meiji, modelo Enz-TR, Japón), se localizaron conidios germinados y con una aguja se tomaron individualmente, los cuales fueron transferidos a placas de Petri (90 mm Ø) que contenían 20 mL del medio de cultivo PDA, las cuales fueron incubadas a 25 °C hasta la obtención de colonias puras.

### **Caracterización cultural**

La identificación de los hongos aislados, inicialmente partió de las características culturales en donde se tomó en consideración: el crecimiento micelial (diámetro expresado en mm) de los aislados, presencia de esporodoquios y esclerocios. Además, se describió el color del anverso y del reverso de las colonias.

### **Caracterización morfológica**

Para realizar la caracterización morfológica de los aislados fúngicos, se indujo previamente la formación de conidios en los aislados monospóricos, éstos fueron transferidos al medio de cultivo Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) para facilitar la formación de macroconidios, y en ellos se incluyeron fragmentos de papel de filtro (Whatman™ N°1) estéril. Asimismo, se usó el medio de cultivo CLA (Carnation Leaf Agar, equivalente a Agar Hoja de Clavel) para inducir la formación de esporodoquios, al cual se le colocaron fragmentos de hojas de clavel estériles, antes que el medio gelificara.

Para la identificación de los aislados fúngicos se prepararon láminas portaobjeto, y se utilizó una gota de lactofenol con azul de algodón la cual fue colocada sobre una porción de micelio. Se examinaron al microscopio las estructuras reproductivas de los diferentes aislados.

Para la evaluación de las características morfológicas en los aislados fúngicos, se consideró la forma de los macroconidios (características de la célula apical, célula basal, pared dorsal y pared ventral). Se observaron 100 macroconidios para determinar sus dimensiones y se

definió el número de septos. Un total de 50 microconidios fueron medidos y también se determinó el número de septos y la forma de los microconidios (ovales, globosos, reniformes, entre otros), la disposición de los microconidios en el conidióforo (aislado, en falsas cabezas, en cadenas, entre otros) y el tipo de conidióforo (monofiálides y polifiálides). Para cada aislado se caracterizaron 10 clamidosporas en aquellos en los cuales se observaron.

Para la clasificación de las especies de hongos según los criterios morfológicos, utilizamos las siguientes claves: Gerlach y Nirenberg (1982), Nelson *et al.*, (1983), Barnett y Hunter (1998), Balmas *et al.*, (2000) así como Leslie y Summerell (2006).

### **3.2.2 Caracterización de las bacterias asociadas**

La caracterización cultural, morfológica y bioquímica se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UCLV. De las plantas estudiadas en las diferentes empresas palmicultoras del cantón San Lorenzo, se obtuvieron aislados bacterianos principalmente de muestras de tejido de la flecha y el meristema, afectado por la PC. Las cepas bacterianas fueron cultivadas en Agar Nutriente enriquecido. El primer criterio de selección fue la tinción de Gram, y se dejaron solamente los que fueron Gram negativos.

#### **Caracterización cultural**

Las colonias bacterianas aisladas fueron crecidas en el medio de cultivo Agar Nutriente. Bajo un microscopio estereoscopio se determinaron los siguientes caracteres culturales: color, elevación, características de los bordes, brillo u opacidad, según lo referido por Benson (1998) y Schaad *et al.* (2001).

#### **Caracterización morfológica**

Para la determinación de la morfología de los aislados bacterianos, se siguieron los criterios de Schaad *et al.* (2001).

### **Caracterización bioquímica de las bacterias asociadas con la pudrición del cogollo**

Para la caracterización bioquímica, los aislados bacterianos fueron cultivados en medio King B (para identificar la presencia de pigmentos fluorescentes) según King *et al.* (1954). El metabolismo Oxidativo/Fermentativo (O/F), se determinó según lo referido por Hugh y Leifson (1953). La hidrólisis de la gelatina, la formación de compuestos reductores a partir de la sacarosa y la actividad pectolítica se evaluaron acorde con lo indicado por Lelliott y Stead (1987). La producción de ácidos a partir del medio Base Peptona Púrpura (del inglés Purple Peptone Base), se realizó según Dye (1968). Finalmente las colonias bacterianas fueron crecidas en medio Agar Nutriente a 36 °C durante 72 h.

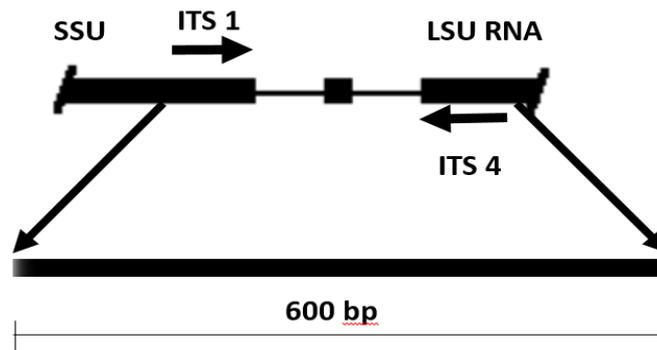
### **3.2.3 Identificación molecular de los agentes asociados de la pudrición del cogollo de la palma de aceite**

Para la identificación molecular de los aislados fúngicos, se utilizaron secuencias de los genes correspondientes a las regiones ITS y 1- $\alpha$  TEF.

#### **Identificación molecular según a la secuencia de la región ITS**

Dos análisis moleculares se realizaron en el laboratorio de genómica funcional del CIGB de la Habana y el resto fueron realizados en el laboratorio de Agrocalidad de Ecuador y en el laboratorio de Fitopatología y Entomología de la Universidad de Estudios de Sazari, en Italia. La extracción del ADN genómico total, se realizó mediante el kit de extracción Trizol ADN (Sigma-Aldrich Co., Mo, USA), acorde con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las concentraciones de ADN se calcularon mediante la medición de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer Pharmacia, LKB) según lo referido por Sambrook *et al.* (1989).

La secuencia amplificada mediante PCR correspondió a la región ITS1-5.8S-ITS4 del ADNr con una talla aproximada de 600 pb, mediante el uso de oligos universales ITS1 e ITS4, según lo referido por White *et al.* (1990). Las secuencias de los oligos para la región ITS1/4 fueron: (F: 5c`-GAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3c` y R: 5c`-CCTCCGCTTATTGATATGC-3c`), respectivamente (figura 11).



**Figura 11.** Mapa de la región ITS donde se muestra la posición de los oligos universales ITS1 e ITS4 utilizados y la longitud aproximada de la región amplificada.

La mezcla de reacción de PCR empleada tuvo un volumen final de 25  $\mu$ L. La misma estuvo compuesta por tampón PCR 10 X (tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM), dNTPs 200 uM, 100 ng de ADN, cebadores específicos ITS4f e ITS4r 10 $\mu$ M de cada uno y 1U de Taq polimerasa (Amplicon). Las amplificaciones fueron desarrolladas en un termociclador (PTC-100; M J Research, Inc), con el desarrollo del programa que aparece en la tabla 2.

**Tabla 2.** Programa utilizado para la amplificación de la región ITS del ADNr.

FASE	T °C	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización Inicial	94	30 s	1
Apareamiento	55	30 s	35
Extensión	72	1 min	32
Extensión final	72	5 min	1

Los productos del PCR, fueron purificados mediante el Kit QIAquick® kit (QIAGEN, Germany) acorde con las instrucciones del fabricante y secuenciados en ambas direcciones en un secuenciador de ADN (ABI prisma automatizado, modelo 377 versión 2.1.1; Applied Biosystems Warrington, United Kingdom), con cebadores ITS4f e ITS4r. El análisis de las secuencias ITS fueron comparadas con secuencias depositadas en la base de datos GenBank, mediante un análisis tipo BLAST.

### **Identificación molecular según a la secuencia la región 1- $\alpha$ TEF**

La identificación molecular se realizó a partir de ADN genómico. Para su extracción se procedió según refirieron Aljanabi y Martínez (1997). Se dispensaron 400  $\mu$ L del tampón de extracción en un tubo Eppendorf estéril (1,5 mL), luego se transfirió el micelio (alrededor de 50-100 mg), previamente homogenizado en un mortero.

Se añadieron 40  $\mu$ L de SDS (20 %) y 8  $\mu$ L de proteinasa K. Las muestras se incubaron a 60° C durante 1 h. Después de la incubación se añadieron 300  $\mu$ L de NaCl saturado (cerca de 5-6 M) y se utilizó agitación mediante Vortex durante 30 s a máxima velocidad.

La suspensión obtenida se centrifugó durante 20 min a 10 000 g, se tomaron 500  $\mu$ L del sobrenadante y se transfirieron a un nuevo tubo estéril de 1,5 mL. En cada tubo se añadieron 500  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló bien mediante inversión.

La mezcla obtenida se incubó a -20 °C durante 1 h y luego se centrifugó a 4 °C, durante 30 min a 17 000 g. El precipitado obtenido después de la eliminación del sobrenadante, se lavó con 100  $\mu$ L de etanol al 70 % [v/v] y se centrifugó durante 4 min a 4 °C a máxima velocidad. Después de la eliminación del sobrenadante, el precipitado se dejó secar en una campana estéril y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua estéril (MilliQ). Una vez determinadas espectrofotométricamente la concentración y pureza del ADN obtenido para cada aislado fúngico, se diluyó a una concentración final aproximada de 50 ng/ $\mu$ L.

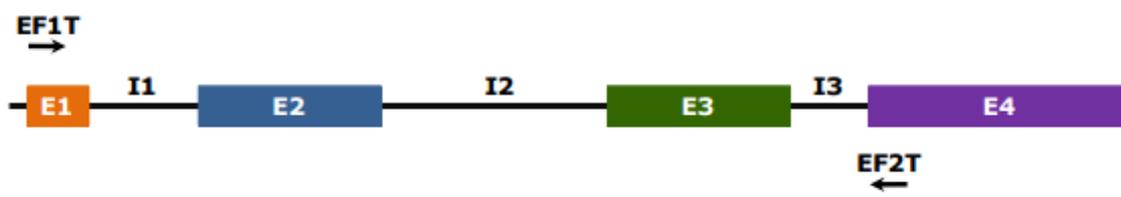
### ***Amplificación***

Se utilizaron 50 ng/ $\mu$ L del ADN genómico para las reacciones de PCR. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (BIORAD).

La mezcla de reacción (50  $\mu$ L total) incluyó las proporciones siguientes:

- 45  $\mu$ L ®Platinum PCR SuperMix Invitrogen.
- 1  $\mu$ L Primers mix (concentración final 200 nM).
- 1  $\mu$ L ADN molde (50 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>).
- 3  $\mu$ L de agua (MilliQ) estéril.

Se utilizaron los siguientes pares de cebadores correspondientes a la región 1- $\alpha$  TEF (Traslado del factor de elongación): ef1: ATGGGTAAGGARGACAAGAC, ef2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (figura 12).



**Figura 12.** Mapa de la región del gen 1- $\alpha$  TEF, que codifica para la traducción del factor de elongación y posición de los oligos utilizados.

Para la reacciones de amplificación se utilizó el siguiente programa (tabla 3).

**Tabla 3.** Programa utilizado para la amplificación de la región correspondiente al gen 1- $\alpha$  TEF que codifica para la traducción del factor de elongación.

FASE	T °C	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	95	1 min	1
Desnaturalización	95	30 min	32
Apareamiento	53	45 min	32
Extensión	72	1 min	32
Extensión final	72	5 min	1

Las reacciones de secuenciación del ADN se realizaron en un volumen de 10  $\mu$ L con 0,5-2  $\mu$ L de la mezcla de reacción ABI BigDye versión 3.1. Para la secuenciación se usaron 50 ng de los amplicones limpios.

Las secuencias de datos fueron editadas y posteriormente alineadas con el programa Sequencher versión 4.1.2 (Gene Codes, Ann Arbor, MI), luego fueron exportados como ficheros anexos. Los ficheros correspondientes fueron importados dentro del programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2007), para luego ser exportados como ficheros FASTA; los mismos fueron alineados mediante la herramienta CLUSTAL-X acorde con lo referido por Larkin *et al.* (2007).

### 3.3 Evaluación de la patogenicidad de los agentes asociados a la pudrición del cogollo en palma de aceite

#### Material vegetal

En el primer ensayo de inoculación se utilizaron 250 plantas de *E. guineensis* de 4 meses de edad procedentes de Quinindé lote 3-2013; y 250 plantas del híbrido Coarí x La Mé de 4 meses, provenientes de la empresa Palmera de los Andes del cantón San Lorenzo (tabla 4).

**Tabla 4.** Descripción de los tratamientos utilizados en el primer ensayo de inoculación en vivero.

Genotipo	Método de inoculación	Órgano inoculado	Aislados	Número de plantas
<i>E. guineensis</i>	Aspersión	Raíz	0112-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión	Flecha	0112-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + lesiones	Raíz	0112-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum	Flecha	0112-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Punción	Flecha	0112-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión	Raíz	0712-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión	Flecha	0712-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + lesiones	Raíz	0712-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum	Flecha	0712-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Punción	Flecha	0712-hongo	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión	Raíz	Bacteria	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión	Flecha	Bacteria	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + lesiones	Raíz	Bacteria	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum	Flecha	Bacteria	15

## *Materiales y Métodos*

<i>E. guineensis</i>	Punción	Flecha	<i>Bacteria</i>	15
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Agua estéril	Raíz		5
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Agua estéril	Flecha		5
<i>E. guineensis</i>	Punción + Agua estéril	Raíz		5
<i>E. guineensis</i>	Punción + Agua estéril	Flecha		5
<i>E. guineensis</i>	Control			5
Híbrido (OxG)	Aspersión	Raíz	<i>0112-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión	Flecha	<i>0112-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión + lesiones	Raíz	<i>0112-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum	Flecha	<i>0112-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Punción	Flecha	<i>0112-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión	Raíz	<i>0712-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión	Flecha	<i>0712-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión + lesiones	Raíz	<i>0712-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum	Flecha	<i>0712-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Punción	Flecha	<i>0712-hongo</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión	Raíz	<i>Bacteria</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión	Flecha	<i>Bacteria</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión + lesiones	Raíz	<i>Bacteria</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum	Flecha	<i>Bacteria</i>	15
Híbrido (OxG)	Punción	Flecha	<i>Bacteria</i>	15
Híbrido (OxG)	Aspersión + Agua estéril	Raíz		5
Híbrido (OxG)	Aspersión + Agua estéril	Flecha		5
Híbrido (OxG)	Punción + Agua estéril	Raíz		5

Híbrido (OxG)	Punción + Agua estéril	Flecha	5
Híbrido (OxG)	Control		5

En el segundo ensayo de inoculación se utilizaron 65 plantas de *E. guineensis* de 4 meses de edad procedentes de Santo Domingo de los Tsáchilas material ASD; y 65 plantas del híbrido Coarí x La Mé de 4 meses, provenientes de la empresa Palmera de los Andes del cantón San Lorenzo (tabla 5). Las condiciones fitosanitarias y vegetativas de las plantas fueron certificadas por la empresa, según sus estándares de calidad establecidos. Se utilizaron 5 plantas por tratamiento, para la primera repetición del ensayo de patogenicidad y otras 5 para el segundo ensayo.

**Tabla 5.** Descripción de los tratamientos utilizados en el segundo ensayo de inoculación en vivero.

Genotipo	Método de inoculación	Órgano inoculado	Aislados (códigos)	Número de plantas
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum	Flecha	0112-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Punción	Flecha	0112-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum	Flecha	063-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Punción	Flecha	063-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum	Flecha	0712-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Punción	Flecha	0712-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum	Flecha	080-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Punción	Flecha	080-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum	Flecha	X3-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Punción	Flecha	X3-hongo	5
<i>E. guineensis</i>	Punción + agua estéril	Flecha	-	5

<i>E. guineensis</i>	Aspersión + Carborundum+ agua estéril	Flecha	-	5
<i>E. guineensis</i>	Control			5
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum	Flecha	0112-hongo	5
Híbrido (OxG)	Punción	Flecha	0112-hongo	5
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum	Flecha	063-hongo	5
Híbrido (OxG)	Punción	Flecha	063-hongo	5
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum	Flecha	0712-hongo	5
Híbrido (OxG)	Punción	Flecha	0712-hongo	5
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum	Flecha	080-hongo	5
Híbrido (OxG)	Punción	Flecha	080-hongo	5
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum	Flecha	X3-hongo	5
Híbrido (OxG)	Punción	Flecha	080-hongo	5
Híbrido	Aspersión + carborundum	Flecha	X3-hongo	5
Híbrido (OxG)	Punción + agua estéril	Flecha	-	5
Híbrido (OxG)	Aspersión + Carborundum+ agua estéril	Flecha	-	5
Híbrido (OxG)	Control		-	5

---

*Inóculos*

Los agentes microbianos que fueron aislados con mayor frecuencia, se inocularon en plantas sanas de palma de aceite y posteriormente se verificó el cumplimiento de los postulados de Koch.

Estos aislados fueron inoculados sobre el hospedante mediante punción en la flecha con agujas estériles reforzadas (debido a la dureza del tejido); el inóculo fue transferido a cada perforación con una jeringa hipodérmica estéril, con la aplicación de 1 mL del inóculo por

punto. En el caso de las inoculaciones mediante aspersión a la flecha con daño mecánico, el daño fue ocasionado con un hisopo de algodón impregnado con carborundo, el cual fue utilizado como objeto abrasivo sobre los tejidos superficiales de la flecha. Para las aspersiones se usaron bombas atomizadoras manuales (Sprayer, modelo Minscraft), las cuales fueron previamente calibradas. Se aplicaron 10 mL de los inóculos por planta de cada tratamiento, tanto en las flechas lesionadas como en las sanas. Para inocular las raíces con y sin lesiones, se retiró el suelo y se inocularon 20 mL.

Los inóculos de los aislados fúngicos que con mayor frecuencia aparecieron, se prepararon a partir de colonias puras crecidas en el medio de cultivo PDA e incubadas a 25 °C durante 8 días en oscuridad. La concentración de inóculo de los aislados fúngicos fue de  $10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , similar a la referida por Castellanos *et al.* (2011), mediante el uso de la cámara de Neubauer (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Islan, NY). En el caso de los aislados bacterianos, éstos fueron crecidos en placas de Petri (90 mm Ø) que contenían 15 mL de Agar Nutriente. Posteriormente, fragmentos de las colonias fueron transferidos a Erlenmeyer de 500 mL que contenían caldo nutriente y se incubaron a 25 °C durante 72 h. Los inóculos bacterianos se prepararon a una concentración aproximada de  $10^8$  ufc.  $\text{mL}^{-1}$ . Tanto los inóculos fúngicos como bacterianos fueron filtrados a través de 3 capas de gasa estéril (modelo, KenAG, Ashland) y se llevaron a la concentración antes mencionada con la adición de agua desionizada estéril.

En el caso del aislado bacteriano, la concentración del inóculo fue de  $1 \times 10^7$  ufc/ mL, acorde con lo sugerido por Sánchez *et al.* (2002) mediante el método de diluciones decimales. El inóculo fue mantenido a 10 °C dentro de recipientes previamente esterilizados y etiquetados, los cuales fueron transportados en una nevera portátil. La suspensión fue agitada antes de ser utilizada.

#### *Condiciones durante la inoculación*

Las plantas una vez inoculadas, fueron colocadas en condiciones de umbráculo con un zaram. Se aplicó un riego semanal por aspersión (cuando no llovió), durante 30 min. La fertilización, se efectuó acorde con lo recomendado para plantas de vivero. La temperatura y precipitaciones (mm), fueron registradas en la estación meteorológica de la empresa Palmera de los Andes (ver anexo 1).

*Evaluaciones*

La evolución sintomatológica del ensayo se llevó a cabo quincenalmente, y llegó a un total de 12 evaluaciones. Los síntomas de clorosis, amarillamiento de las hojas cercanas a la flecha, se referenciaron con la carta de colores Pantone (Ciarepro, 2013). Además, se consideró la necrosis descendente a nivel de la flecha. Las plantas con los síntomas anteriormente mencionados fueron fotografiadas y registradas en una base de datos. Las plantas con síntomas asociados a la PC, se estudiaron en el laboratorio de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y se tomaron porciones de tejido de raíz, base de raíz, flecha y meristema, similar a lo descrito por Agrios (2005). El traslado de las plantas se realizó en un vehículo acorde con las recomendaciones de AGROCALIDAD ESMERALDAS. La ruta de movilización fue: San Lorenzo, Lita, Ibarra, Quito, Riobamba. Cada planta transportada fue etiquetada con su código correspondiente.

Para el análisis en laboratorio se retiró toda la tierra de las raíces y se lavó con agua corriente. El número de raíces se contabilizó según su condición (sanas, necrosadas parcialmente y necrosadas totalmente). De las raíces necrosadas se tomó una porción de tejido de interfase (tejido sano y enfermo) con 2 cm de longitud; las muestras obtenidas de la base de raíz fueron cortadas transversalmente entre el sitio de unión de las raíces y el tallo: se cortó un disco de aproximadamente 4 mm de espesor y se cortaron secciones finas de tejido de forma rectangular.

La parte aérea de la planta (hojas) fue cortada continuamente hasta llegar a la parte central (flecha y base de flecha). La zona meristemática fue cortada longitudinalmente con el fin de observar su estado. La muestra tomada del meristema se cortó en secciones rectangulares pequeñas. Las muestras de flecha fueron tomadas de la parte central. En caso de existir necrosis se tomaron muestras de tejidos ubicados en la interfase tejido sano-tejido enfermo. Estas fueron lavadas en recipientes agujereados desde la parte media en un flujo continuo de agua corriente durante 20 min. Transcurrido el lavado se añadió una solución de hipoclorito de sodio al 5 % por 5 min; finalmente se enjuagó con agua estéril, de modo similar a lo referido por Ronquillo (2012).

Las siguientes etapas fueron realizadas dentro de la cámara de flujo laminar, previamente esterilizada con desinfectante orgánico y rayos UV durante una hora. Las muestras de tejido obtenidas fueron colocadas en papel de filtro (Whatman™ N°4) para retirar el exceso de humedad. Una vez secas, se transfirieron a placas de Petri (90 mm Ø), que contenían medio Agar Agua al 2 % previamente esterilizado. Las muestras colocadas en las placas de Petri, fueron selladas con cinta adhesiva e incubadas a 25 °C, similar a lo referido por Dhingra y Sinclair (1995). Se realizó el seguimiento de las muestras sembradas en Agar Agua, para detectar desarrollo del micelio y posteriormente transferirlo a placas de Petri con medio PDA estéril e incubado a 25 °C. En caso de existir crecimiento bacteriano en el medio Agar Agua, se transfirieron al medio Agar Nutriente estéril y se sembraron mediante agotamiento por estrías, hasta observar colonias puras, las cuales fueron incubadas a 25 °C.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Caracterización sintomatológica y determinación de la incidencia e intensidad de ataque de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en San Lorenzo

Los primeros síntomas asociados con la PC de la palma de aceite en San Lorenzo, se caracterizaron por la presencia de plantas con hojas cloróticas en la zona cercana al paquete de flecha, las cuales se amarillaron progresivamente. Se observó necrosis de los folíolos de las hojas cercanas al paquete de flechas. La clorosis, el amarillamiento y la necrosis siguieron un mismo patrón, desde la punta de los folíolos hacia la base. Estos síntomas sólo se observaron en las hojas jóvenes (hojas cercanas a la flecha) (figura 13).



**Figura 13.** Síntomas del inicio de la pudrición del cogollo en plantas de *E. guineensis* en San Lorenzo. Hojas cloróticas en zona cercana a la flecha (a), clorosis del paquete de flechas (b), amarillamiento progresivo de hojas en la zona cercana a la flecha (c).

Posteriormente se observó que las plantas presentaron manchas necróticas aisladas o coalescentes, que aparecieron en la parte basal y distal de la flecha sin abrir que afectaron los folíolos internos. Asimismo, se detectó una necrosis descendente y deformación de los folíolos en las hojas afectadas (figura 14).



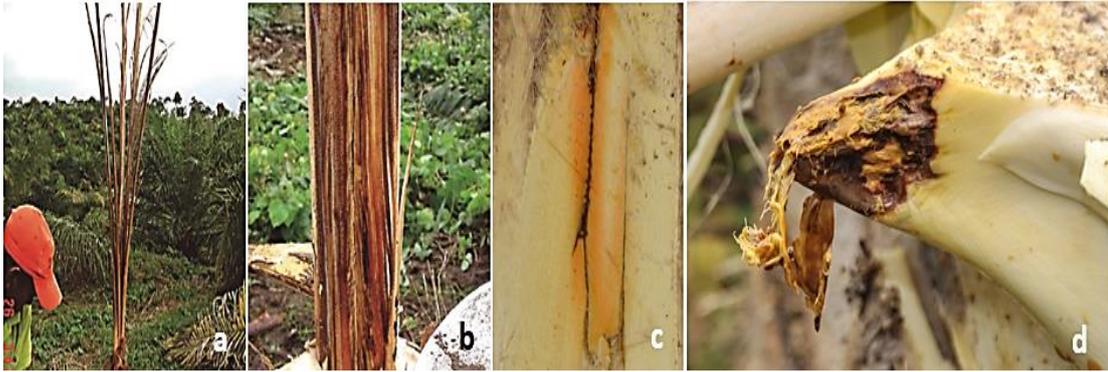
**Figura 14.** Síntomas de necrosis en plantas de *E. guineensis* en San Lorenzo. Puntos necróticos en el borde del paquete de flechas aislados (a), necrosis descendente en el paquete de flechas y deformación en los folíolos de las hojas afectadas (b).

A medida que la necrosis avanzó hacia el meristema, se observaron algunos peciolos de hojas abiertas, con un aumento en el ángulo de apertura de la hoja, lo cual provocó un doblamiento del raquis con una curvatura de las hojas hacia abajo o epinastia. Además, se observaron plantas donde ocurrió ruptura del raquis a nivel del tercio inferior de las hojas, lo cual provocó necrosis descendente y deformación de los folíolos (figura 15).



**Figura 15.** Síntomas de necrosis y pudrición de flechas en *E. guineensis* en San Lorenzo. Ruptura del raquis en el tercio inferior en planta joven (a) y adulta (b) en campo.

La necrosis continuó su avance hacia el interior del paquete de flechas, el cual fue afectado completamente incluyendo el meristema. A nivel del meristema apical se observó un color anaranjado pálido a salmón, que en estado avanzado causó la pudrición húmeda del tejido, acompañada de olores fétidos (figura 16).



**Figura 16.** Necrosis del paquete de flechas y meristema (a y b), presencia de un color anaranjado pálido a salmón en el meristema apical (c), pudrición húmeda del tejido acompañada de olores fétidos (d).

Asimismo, se observó que la necrosis y pudrición avanzaron por debajo del nivel del meristema apical, lo cual provocó la desintegración del tejido meristemático y del ápice y condujo al síntoma de cráter u oquedad. Un aspecto que permitió identificar las plantas en este estado en campo, fue el cese de la emisión de nuevas hojas (figura 17).



**Figura 17.** Plantas jóvenes que dejaron de emitir nuevas hojas (a), necrosis y pudrición del cogollo (b), desintegración completa del meristema con apariencia de cráter (c).

La caracterización de la sintomatología de la PC de plantas enfermas de palma de aceite (*E. guineensis*) en San Lorenzo, permitió confeccionar una escala cuantitativa de evaluación para poder cuantificar la intensidad de ataque en las principales empresas palmicultoras de este cantón, perteneciente a la provincia de Esmeraldas (Tabla 6).

**Tabla 6.** Escala cuantitativa de evaluación de la pudrición del cogollo según la sintomatología observada en San Lorenzo.

<b>Grado</b>	<b>Descripción de los síntomas expresados en porcentaje</b>	<b>Clasificación del daño</b>
0	Sin síntomas visibles	Sin daño
1	Lesiones del 0,1 al 25 % del área externa de flechas	Leve
2	Lesiones del 25,1 al 50 % del área externa de flechas	Moderado
3	Lesiones del 50,1 al 75 % del área externa de flechas	Severo
4	Lesiones del 75,1 al 100 % del área externa de flechas	Muy severo
5	No hay emisión de flechas y formación de cráter	Extremadamente severo

En la evaluación de la plantación de *E. guineensis* del año 2002, como promedio las plantas que estaban en Grado 0 tenían 35 hojas, mientras las plantas que estaban en grado 5 tenían un promedio de 14 hojas, lo cual representó una pérdida aproximada del 60 % del total de hojas. En la plantación del año 2008, las plantas tuvieron como promedio 37 hojas en Grado 0 y 17 hojas en Grado 5, que provocó una pérdida del 54 % de hojas totales. En promedio ambas plantaciones perdieron aproximadamente el 57 % del total de hojas. Por otra parte, las plantas en estado de cráter (Grado 5) como promedio quedaron con 19 hojas, perdiéndose aproximadamente 22 hojas (56,66 %) en relación con las plantas sanas.

La pérdida foliar ocurrió debido a que la planta afectada por la PC disminuyó la capacidad de emitir nuevas flechas, y las existentes se necrosaron a medida que avanzó la infección. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nieto *et al.* (1996), quienes señalaron que la PC provocó la detención en la emisión y maduración de nuevas flechas. Asimismo, Martínez *et al.* (2007), indicaron que la PC avanzó por el paquete central y eliminó la posibilidad de emitir nuevas hojas y continuar con el proceso normal de desarrollo de una palma sana.

En las plantas establecidas en 2002 y 2008, la altura desde la base del tallo hasta el último racimo se redujo en un 31,5 %; mientras que la altura desde la base de la planta al meristema disminuyó en un 39 %. Estos resultados concuerdan con lo citado por Nieto *et al.* (1996), quienes indicaron que la PC detuvo la emisión de nuevas hojas y con ello el crecimiento y la productividad de la planta (Louise *et al.*, 2007).

En las plantaciones de *E. guineensis* de los años 2002 y 2008 desde el Grado 0 hasta el Grado 5, la altura al último fruto se redujo en el 13 % y 50 % respectivamente; mientras que la altura desde la base de la planta al meristema para la plantación del año 2002 disminuyó en el 15 % y para la plantación del año 2008 en el 63 %. Los resultados tanto para *E. guineensis* como para el híbrido interespecífico Coarí x La Mé, mostraron que la altura al último fruto y la altura desde la base de la planta al meristema es menor mientras el avance del ataque aumenta. Estos resultados concuerdan con lo citado por Nieto *et al.* (1996), quienes señalaron que la PC detiene el desarrollo futuro de la planta, y con Louise *et al.* (2007), quienes manifestaron que las plantas afectadas por la PC redujeron su crecimiento y desarrollo.

A nivel de flechas sin abrir al inicio, se presentaron pequeñas lesiones necróticas de color marrón en la parte basal y distal de la flecha; o manchas necróticas en los bordes de los foliolos. Posteriormente, las manchas necróticas aumentaron de tamaño en los foliolos y raquis a medida que avanzó la enfermedad, y afectaron a los foliolos internos de las flechas sin abrir. A medida que la flecha se abrió, la necrosis y la pudrición avanzaron en sentido ascendente y descendente (en relación con el meristema apical). Se observó afectación de los tejidos externos e internos de las flechas. Posteriormente, la necrosis y la pudrición seca o húmeda de las flechas, llegaron hasta el paquete de flechas, lo cual ocasionó pudrición del mismo y desintegración de los tejidos. Las plantas finalmente mostraron la apariencia de cráter u oquedad a nivel del cogollo.

Con la escala evaluativa elaborada, se podría evaluar la respuesta del germoplasma de palma de aceite de Ecuador, lo cual sería de gran ayuda para asistir el mejoramiento genético y seleccionar individuos tolerantes/resistentes a la PC.

En la evaluación del parámetro relativo al ángulo de inserción de las hojas en el estipe, en las plantaciones de los años 2002 y año 2008, desde Grado 0 hasta Grado 4, en promedio todas

las hojas analizadas registraron un incremento del ángulo en 2,7°. Se apreció que mientras el grado de ataque aumentó, el ángulo de inserción de la hoja se incrementó, lo cual fue notorio en las plantas en Grado 4.

La sintomatología no varió con la edad de la plantación y la presencia de epinastia concuerda con lo referido por Chinchilla (2008). A nivel del meristema apical, el avance descendente del ataque en las plantaciones de los años 2002 y 2008 (Grado 1), como promedio, alcanzó 0,25 m por encima del meristema; mientras el ataque en Grado 4 llegó a nivel del meristema apical, e incluso descendió este nivel en las plantas que presentaron Grado 5, lo cual es similar a lo informado por Jiménez (1991) y De Franqueville (2003).

La clorosis observada en los folíolos inferiores de las hojas más jóvenes coincide con lo referido por Turner (1988). El amarillamiento y la pudrición de la flecha observados fueron similar a lo referido por Ronquillo (2013). Por otra parte, Cooper (2011) sugirió que la marchitez asociada con la PC en la palma de aceite, se manifestó con un amarillamiento de las hojas jóvenes desde la base de las mismas hasta el ápice, que condujo a la muerte de la planta.

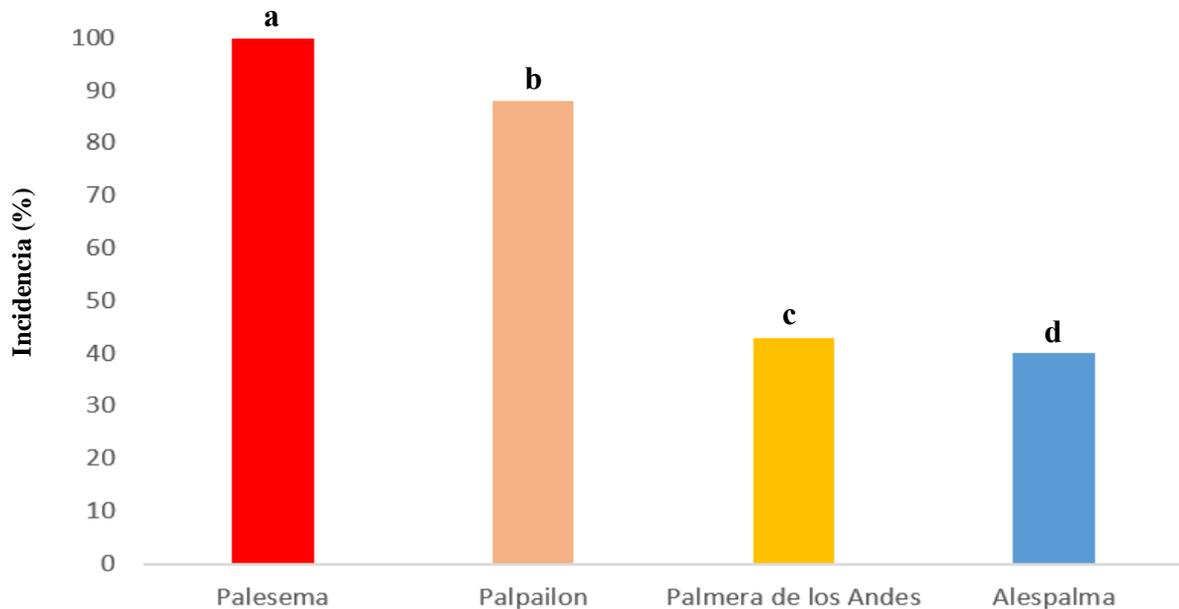
En San Lorenzo el amarillamiento siempre progresó hasta la necrosis de las hojas y en ocasiones culminó con la muerte de la yema apical. De Franqueville (2003) expuso que la PC comienza con la pudrición de la flecha, la cual puede alcanzar la zona meristemática. Este autor sugirió que si las condiciones son favorables, puede causar la muerte de la planta.

En relación con la presencia de lesiones necróticas en los folíolos de las hojas infectadas, se asemeja con lo obtenido por Martínez y Torrés (2007), quienes señalaron la presencia de lesiones necróticas que comenzaron en las flechas y luego se observaron en el tejido de las hojas centrales, lo cual limitó su crecimiento.

Como resultado del análisis de los síntomas observados en San Lorenzo, se logró confeccionar una escala diagramática cuantitativa, la cual podría ser utilizada para calcular la intensidad de ataque en este cantón.

La mayor incidencia de la PC se mostró en la empresa Palesema (100 %). Luego le siguieron las empresas Palpailón (88 %), Palmera de los Andes (43 %) y Alespalma (40 %).

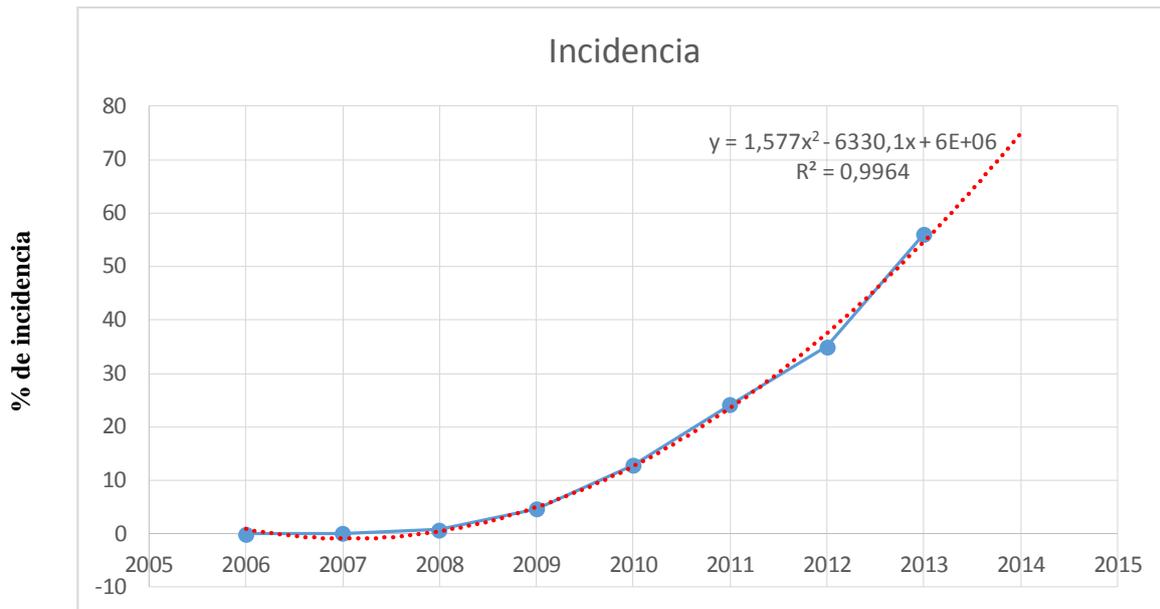
Entre todas las empresas se observaron diferencias estadísticas (figura 18). La incidencia promedio en San Lorenzo fue de 66,75 %, lo cual evidenció el gran número de plantas afectadas en el período evaluado.



**Figura 18.** Evaluación de la incidencia expresada en porcentaje, de la pudrición del cogollo en *E. guineensis* en cuatro empresas palmicultoras de San Lorenzo. Rangos promedios con letras diferentes en una misma columna, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para  $p < 0.05$  con  $n=10$ .

Al procesar la información de la incidencia en palma de aceite desde el año 2006 hasta 2013, se determinó una ecuación polinomial, que permitió inferir la progresión de la PC para el año 2014, sobre la base de la incidencia acumulada. Asimismo se observó un incremento exponencial en la incidencia de la PC en esta región, que fue para finales del año 2013 del 56 %, mientras para el 2014 se estimó sería del 78,30 % (figura 19).

En relación con el resultado anterior, Louise *et al.* (2007) indicaron que la PC en la zona de Tumaco (Colombia) comenzó en 2004, mientras que en San Lorenzo, Ecuador, según información proporcionada por la empresa Palmera de los Andes, se detectó en 2006.



**Figura 19.** Proyección de la incidencia acumulada expresada en porcentaje de la PC, en plantaciones de empresas palmicultoras de San Lorenzo.

En Palmera de los Andes se reportaron los primeros casos aislados en agosto de 2006 (lotes colindantes con Palesema) y para 2008 ocurrió un incremento notable en el número de casos registrados en las parcelas donde se formaron los primeros focos con un 30 % de mortalidad. En la empresa Alespalma, los primeros focos se presentaron en 2006 en la zona de Ricaurte (Lotes: R001 y R002) donde se perdió toda la plantación, la cual fue replantada con *E. guineensis*. A su vez este material comenzó a afectarse en 2010 debido a la colindancia con la empresa Palpailón (Lotes: S0501, S0007, S0017 y S0023).

En Palesema, la dispersión de la PC sucedió en dirección Noreste a Sureste, en esta se dejaron en pie todos los lotes afectados para labores de cosecha, lo que favoreció la dispersión de la enfermedad. Al integrar estos datos y en consideración de la dirección predominante del viento en San Lorenzo, se infiere que la PC observada en Colombia (zona de Tumaco, 1980), pudo dispersarse hacia la empresa Palesema, seguidamente fueron afectadas las empresas: Palmera de los Andes (zona de Chanul), Alespalma (zona de Ricaurte), Energy & Palma (zona de Sarria), Palpailón (zona colindante con Palesema), Ales Palma (zona colindante con Palpailón) y finalmente Palmera de los Andes (zona de Najurungo y Sande, colindantes con Alespalma).

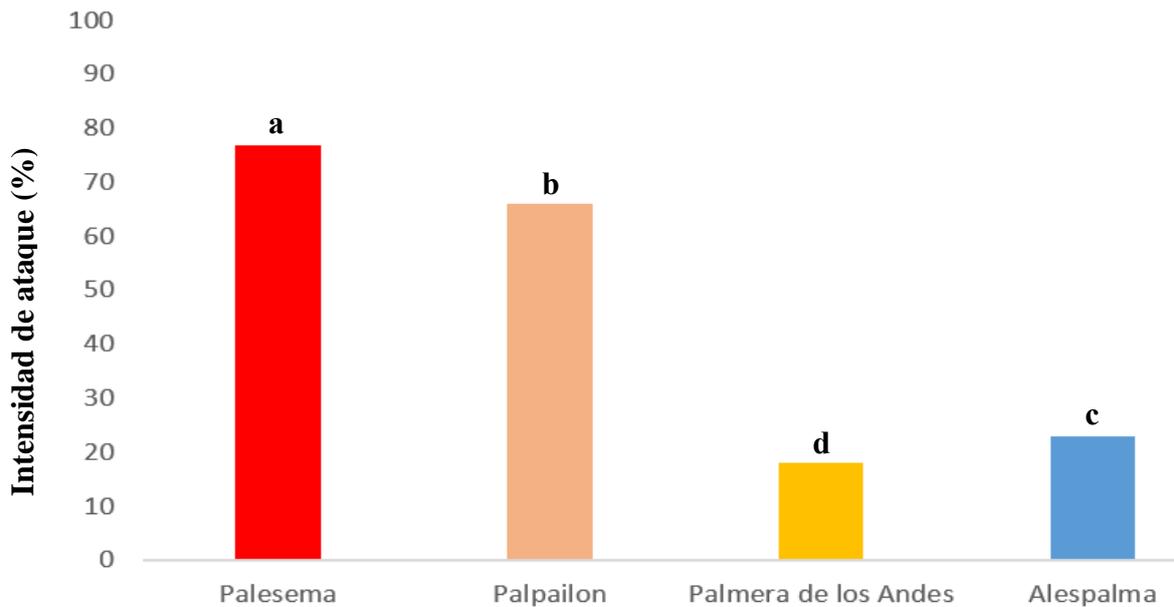
Los resultados coinciden con las investigaciones realizadas por Laing (2010), quien señaló que las incidencias de la PC ocurren en palmas aisladas o en grupos casi simultáneamente. Grupos de palmas contiguas en una zona específica, pueden mostrar los primeros síntomas casi simultáneamente en micro sitios que son denominados frecuentemente como “focos de infección”.

Van de Lande *et al.* (1999) al realizar estudios epifitiológicos en Surinam, indicó que la PC se disemina en el sentido de la dirección del viento, lo cual coincide con lo observado en San Lorenzo.

Con los resultados obtenidos en la caracterización sintomatológica de la PC en San Lorenzo, se abren nuevas oportunidades para realizar estudios epifitiológicos que combinen tanto métodos clásicos como modernos para realizar un análisis más preciso de la progresión de la enfermedad basada en los patrones espaciales y temporales de su diseminación en las empresas palmicultoras de esta región. En este sentido, sería interesante profundizar sobre el modo de dispersión, determinar la densidad de estructuras infectivas de cada especie del complejo *Fusarium*, identificar y cuantificar las fuentes de inóculo primario dentro y fuera de las plantaciones de palma aceitera, generar modelos estadístico-matemáticos que describan con mayor precisión la progresión de la PC y que tengan en cuenta las variables climáticas (temperatura, humedad, acumulado de precipitaciones) de los sitios evaluados.

Acorde a la escala de severidad conformada en el presente trabajo, la mayor intensidad de ataque se apreció en la empresa Palesema (77 %). Luego siguieron las empresas: Palpailón (66 %), Alespalma (23 %) y Palmeras de los Andes (18 %).

Entre todas las empresas existieron diferencias estadísticas significativas (figura 20). La intensidad de ataque promedio para San Lorenzo fue de 46 %, lo cual mostró un ataque de moderado acorde con la escala evaluativa para determinar la severidad.



**Figura 20.** Evaluación de la intensidad de ataque expresada en porcentaje en plantaciones de empresas palmicultoras de San Lorenzo. Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para  $p < 0.05$  con  $n = 10$ .

Según Arias (2014), cuando la incidencia acumulada de la PC es inferior a 10 %, es posible controlar la enfermedad. Sin embargo, cuando la incidencia acumulada de la PC es superior al 20 % ya no es rentable implementar estrategias de control de la PC. En tales situaciones, lo aconsejable es destruir todas las palmas y plantar variedades tolerantes o resistentes.

Luego de observar los datos climáticos (humedad relativa, temperatura y dirección predominante del viento), se corroboró que en la zona de San Lorenzo existieron condiciones favorables para el desarrollo y progreso de la PC expresado en incidencia acumulada e intensidad de ataque (Anexo 2). Sin embargo, la intensidad de ataque promedio para este cantón fue del 46 % equivalente a un daño moderado acorde con la escala evaluativa elaborada en este acápite.

Al analizar los resultados correspondientes a la caracterización de los síntomas de la PC en palma de aceite en San Lorenzo, Ecuador, así como su incidencia y severidad, se determinó la presencia de clorosis y amarillamiento de hojas jóvenes al inicio de la PC. Posteriormente se observaron puntos necróticos, necrosis descendente y deformación de los folíolos. En algunas plantas la necrosis alcanzó el meristema apical, mientras en otras existieron

putrefacciones húmedas y fétidas. Con la caracterización sintomatológica realizada, se confeccionó una escala evaluativa, que permitió determinar la magnitud del daño causado por la PC en San Lorenzo. La incidencia en las principales empresas palmicultoras como promedio fue superior al 66 % y del 100 % para Palesema. Por otra parte, la severidad expresada en intensidad de ataque, fue superior al 46 % y del 77 % para Palesema. Al tomar en consideración estos resultados, se ilustra la importancia que tiene la PC en San Lorenzo y con ello la necesidad de caracterizar e identificar a los agentes causales asociados, para poder trazar estrategias de manejo eficientes.

#### **4.2 Identificación según los caracteres culturales, morfológicos, bioquímicos y moleculares de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite**

El 70 % de los aislados obtenidos pertenecieron al género *Fusarium*, el cual fue aislado con mayor frecuencia. Luego siguieron las bacterias que representaron el 25 %. En menor proporción aparecieron aislados de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chalaropsis*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Pestalotiopsis* y *Penicillium* (tabla 7).

En relación con este resultado, Ronquillo *et al.* (2013) realizaron un análisis de frecuencia de los géneros de hongos asociados con síntomas de PC en palma de aceite en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador, y determinaron que el género *Fusarium* fue predominante, lo cual coincide con nuestros resultados. Sin embargo, estos autores identificaron a los géneros: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Nigrospora*, *Phoma* y *Polipore*, no encontrados en los aislamientos nuestros. A su vez, no encontraron a los géneros *Aspergillus*, *Diplodia*, *Chalaropsis* y *Penicillium*, que se obtuvieron en el presente trabajo.

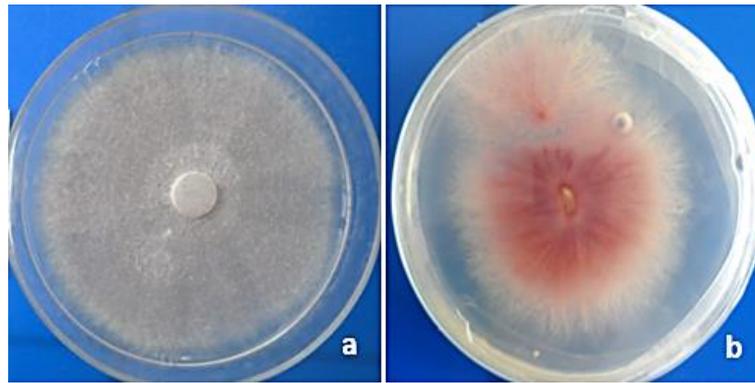
**Tabla 7.** Porcentaje de microorganismos aislados a partir de diferentes órganos de la palma de aceite con síntomas de pudrición del cogollo en San Lorenzo, provincia Esmeraldas, Ecuador.

Microorganismos aislados	Número de aislados obtenidos	Porcentaje (%)	Órgano del cual fueron aislados
<i>Alternaria</i>	3	1,35	Cogollo
<i>Aspergillus</i>	1	0,45	Flecha
<i>Chalaropsis</i>	4	1,80	Raíz y cogollo
<i>Colletotrichum</i>	1	0,45	Cogollo
<i>Diplodia</i>	2	0,90	Cogollo
<i>Fusarium</i>	155	69,81	Raíz, cogollo y flecha
<i>Pestalotiopsis</i>	2	0,90	Flechas
<i>Penicillium</i>	1	0,45	Cogollo
<i>Bacterias</i>	55	24,77	Raíz, cogollo y flecha

#### 4.2.1 Caracterización cultural y morfológica de los hongos asociados

##### *F. oxysporum*

Las colonias de *F. oxysporum* crecidas en el medio de cultivo PDA fueron muy variables, así como los pigmentos difundidos en el medio de cultivo (incoloro, violeta pálido, violeta oscuro, magenta oscuro). Las colonias presentaron bordes regulares, textura principalmente algodonosa; el color del anverso fue variable; aunque prevalecieron los colores: blanco y blanco-grisáceas (PANTONE 420) (figura 21 a). Por otra parte, la pigmentación en Agar del reverso de las colonias fue violeta pálido (PANTONE 812) y violeta oscuro. Asimismo hubo ausencia de líquido de transpiración (figura 21) y la velocidad de crecimiento promedio de los aislados de *F. oxysporum* fue de 3,60 mm.d<sup>-1</sup>.

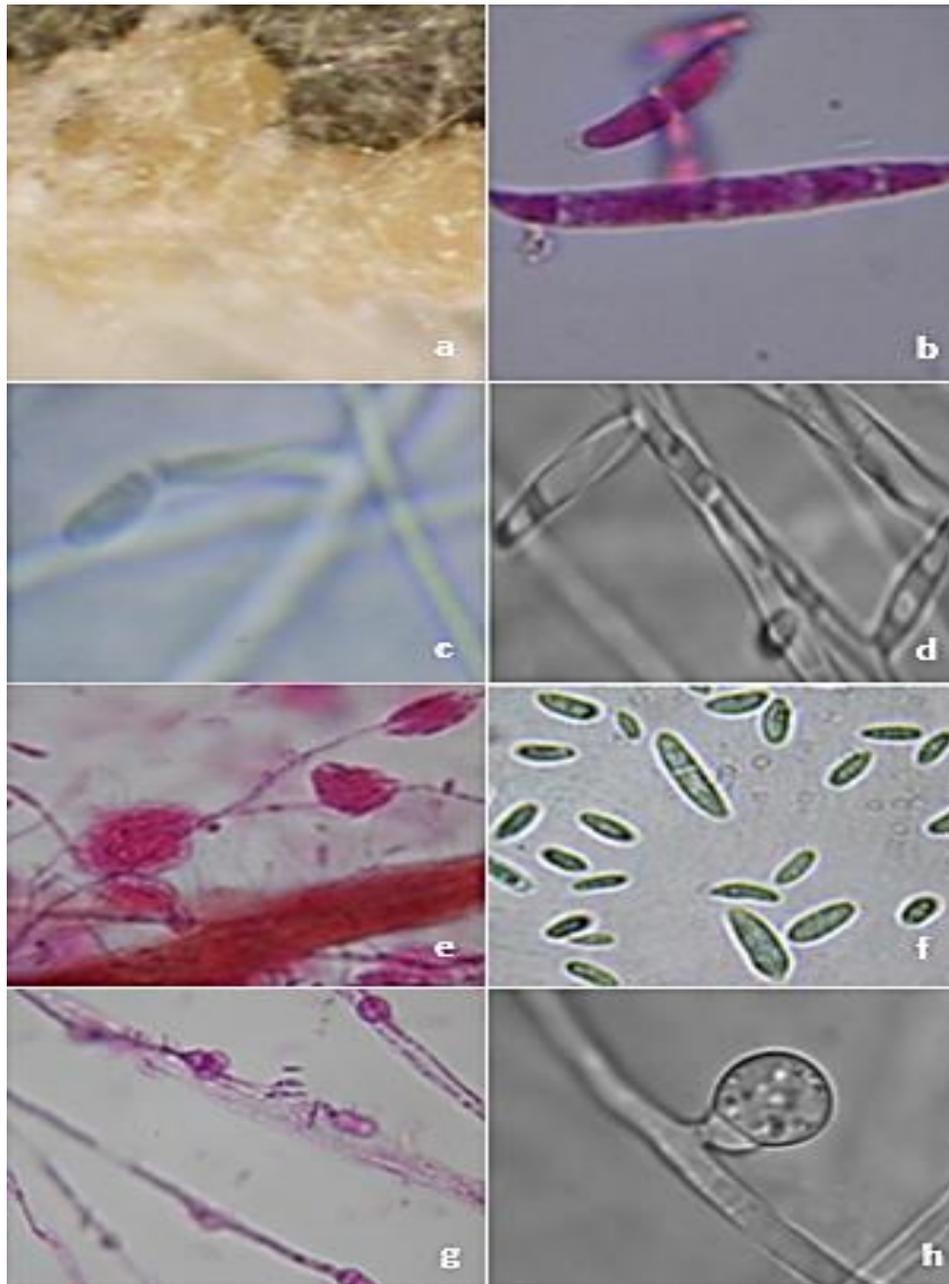


**Figura 21.** Características culturales de *F. oxysporum* (cepa 0112) crecido en el medio de cultivo PDA (Scharlau) a 25 °C e incubadas durante 8 días. Color del anverso de la colonia (a), color del reverso de la colonia (b).

Los aislados de *F. oxysporum* formaron esporodocios (figura 22 a) que presentaron macroconidios de longitud corta a media (29,81  $\mu\text{m}$  de largo x 2,55  $\mu\text{m}$  de ancho) en forma de bote, ligeramente curvados a casi rectos (figura 22 b). La célula apical de los macroconidios fue en forma de gancho o ligeramente engrosada. A su vez, la célula del pie de los macroconidios fue mellada o con forma de pie. Usualmente los macroconidios presentaron 3 septos.

Se observaron microconidios (13,87  $\mu\text{m}$  de largo x 2,74  $\mu\text{m}$  de ancho) con formas ovales, elipsoidales, reniformes, usualmente no septados a pesar de observar algunos con un solo septo. Se observaron falsas cabezas (figura 22 e) en la formación de los microconidios (figura 22 f). Las células conidiógenas dieron lugar a monofiálides con forma de frasco o de bolos (figura 22 c, d). Se observaron abundantes clamidosporas (8,54  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio) en cultivos de 3-4 semanas en el medio SNA, las cuales usualmente aparecieron solas o en parejas (figura 22 g, h).

Las características culturales y morfológicas observadas en los aislados de *F. oxysporum*, fueron similares a las referidas por Ronquillo *et al.* (2013), quienes en el año 2011 realizaron un estudio para determinar la etiología del agente causal de la pudrición de la corona en *E. guineensis* en la provincia de Esmeraldas, Ecuador. Asimismo, coincidieron con las características informadas por Leslie y Summerrell (2006).

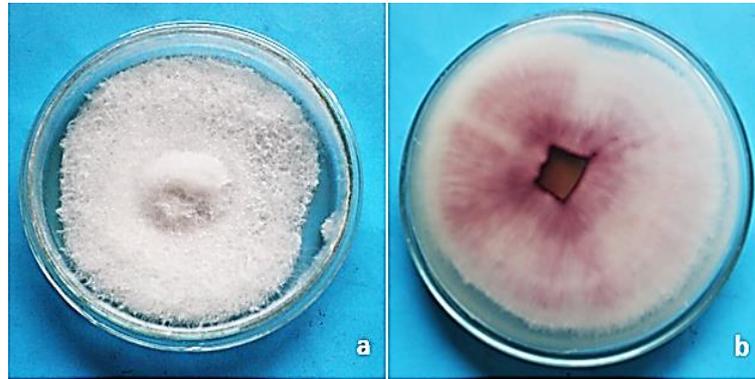


**Figura 22.** Caracteres morfológicos utilizados en la identificación de aislados de *F. oxysporum* crecidos en el medio de cultivo CLA (a, b, e), SNA (c, d, f, g, h) a 25 °C e incubadas durante 15 días. Esporodocios (a), macroconidios (b), monofiálides (c, d), falsas cabezas (e), microconidios (f), clamidosporas (g, h).

### *F. proliferatum*

En cambio, las colonias de *F. proliferatum* crecidas en el medio de cultivo en PDA y en CLA presentaron un micelio blanco con textura algodonosa con pigmentación variable

(incoloras a violeta pálido, gris-violeta, grisáceo-naranja, violeta, violeta oscuro y magenta oscuro). El color del anverso fue blanco crema (PANTONE 9080) mientras el reverso fue violeta pálido (PANTONE 214), con ausencia de líquido de transpiración (figura 27). La velocidad de crecimiento micelial radial fue de 2,22 mm.d<sup>-1</sup>.

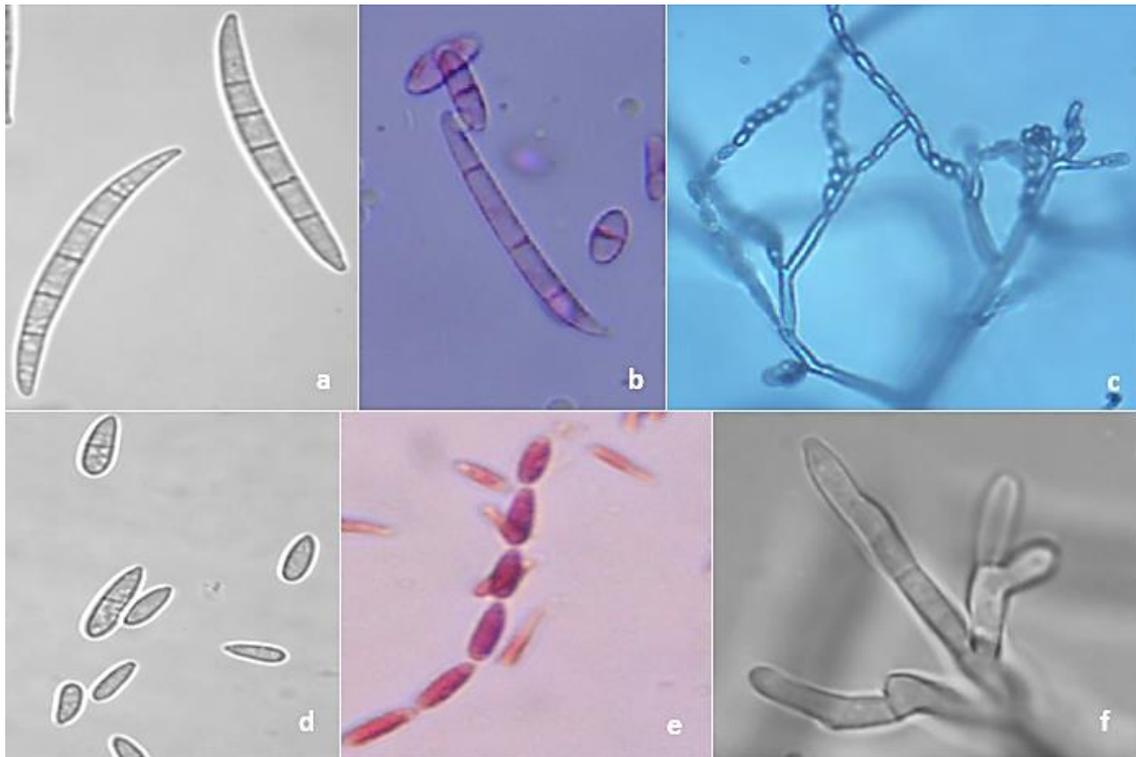


**Figura 27.** Morfología de la colonia de *F. proliferatum* crecida en el medio de cultivo PDA (Scharlau) a 25 °C e incubada durante 8 días. Color del anverso de la colonia (a), color del reverso de la colonia (b).

Los macroconidios (30,78  $\mu\text{m}$  de largo x 2,55  $\mu\text{m}$  de ancho) de los aislados de *F. proliferatum* fueron largos, delgados, relativamente rectos, con paredes ventrales y dorsales paralelas (figura 28 a, b). La célula apical de los macroconidios fue cónica o ligeramente curvada. La célula del pie de los macroconidios fue curvada o en forma de pie. Los macroconidios presentaron de 3-7, más frecuentes aquellos que tenían 5 septos.

Los microconidios (12,13  $\mu\text{m}$  de largo x 2,55  $\mu\text{m}$  de ancho), presentaron formas ovoide con la base truncada, oval, elipsoidal y raramente piriforme (figura 28 d). Estos microconidios se formaron en cadenas (figura 28 c, e) en falsas cabezas conidiales. Se observó la presencia de monofiálides y polifiálides (figura 28 f) en las células conidiógenas. Ausencia de clamidosporas.

Las características culturales y morfológicas de esta especie fueron similares a las referidas por Leslie y Summerell (2006).

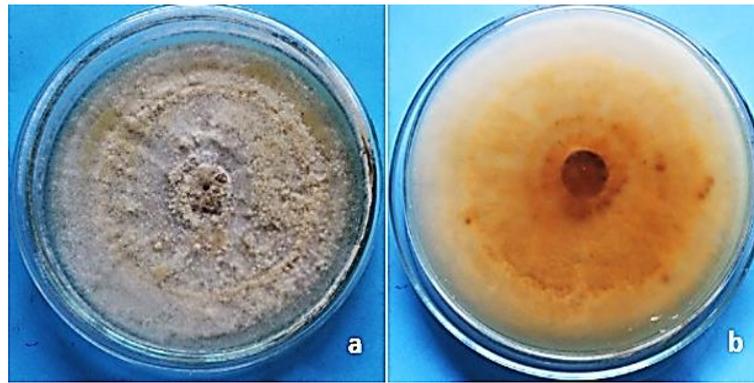


**Figura 28.** Caracteres morfológicos utilizados en la identificación de aislados de *F. proliferatum* crecidos en el medio de cultivo CLA (a, b) y SNA (c, d, e f) a 25 °C e incubadas durante 15 días. Macroconidios (a, b), microconidios en cadenas (c, e) microconidios uni y bicelulares (d), polifialides (f).

### *F. semitectum*

*F. semitectum* presentó colonias con abundante micelio con aspecto denso. El anverso de las colonias fueron de color de gris-amarillento (PANTONE 416), mientras el reverso fue naranja-pálido (PANTONE 164), con ausencia de líquido de transpiración (figura 29). La velocidad de crecimiento promedio fue de 4,69 mm.d<sup>-1</sup>.

Leslie y Summerel (2006) señalaron que las colonias de *F. semitectum* sobre PDA producen abundante micelio denso, con color blanco al inicio y luego con la edad cambian a beige o carmelita. Asimismo algunos aislados muestran colores carmelita pálido a pardo grasiento por el reverso (Balmas *et al.*, 2000).

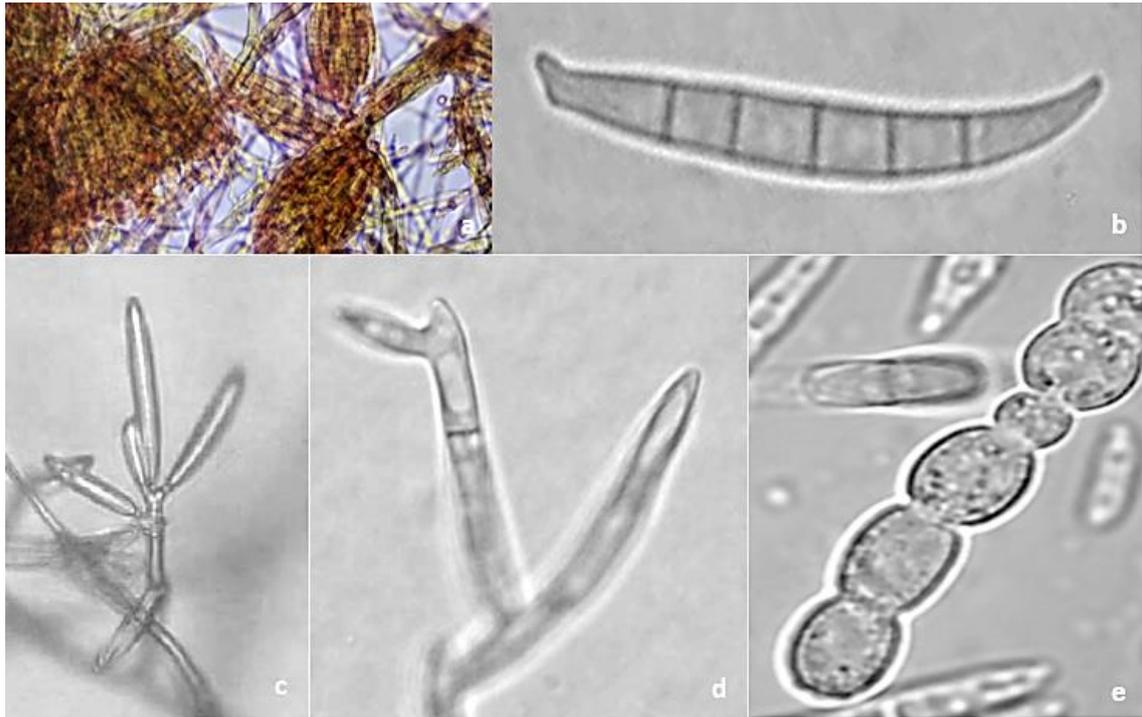


**Figura 29.** Morfología de la colonia de *F. semitectum* crecida en el medio de cultivo PDA (Scharlau) a 25 °C e incubada durante 8 días. Color del anverso de la colonia (a), color del reverso de la colonia (b).

*F. semitectum* mostró dos tipos de macroconidios (27,72  $\mu\text{m}$  de largo x 3,97  $\mu\text{m}$  de ancho), al tomar en consideración si fueron originados a partir de esporoquios (figura 30 a, b) o si procedían directamente del micelio (figura 30 c). Aquellos macroconidios formados fueron ligeramente curvados, mientras que aquellos que fueron formados a partir del micelio (mesoconidios según algunos autores), fueron rectos y en forma de huso, frecuentemente producidos en parejas en forma de “orejas de conejo” (figura 30 c).

La célula apical se estrechó a un punto, el cual fue ligeramente curvado, mientras la célula del pie de los macroconidios fue en forma de pie, papilada o quebrada. Los macroconidios presentaron de 3-5 septos, mientras los microconidios (9,40  $\mu\text{m}$  de largo x 2,84  $\mu\text{m}$  de ancho) de forma fusiforme u oval, fueron escasos con 0-1 septo (figura 30 e). Se detectó la presencia de polifialides (figura 30 d) y se observaron solo muy pocas clamidosporas (figura 30 e).

Las características morfológicas observadas en los aislados de *F. semitectum*, fueron similares a las referidas por Leslie y Summerell (2006).



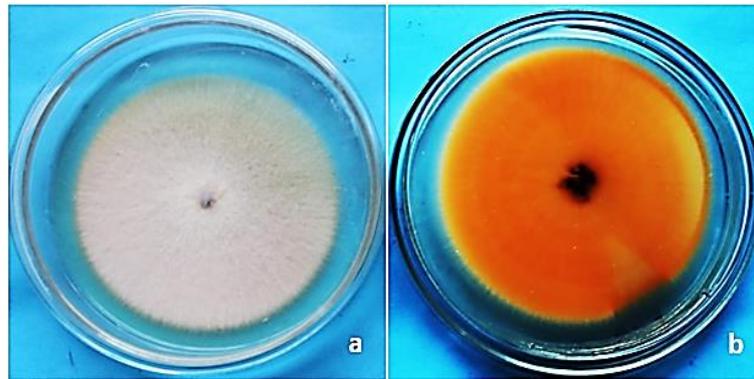
**Figura 30.** Caracteres morfológicos utilizados en la identificación de aislados de *F. semitectum* crecidos en el medio de cultivo CLA (a, b), SNA (c, d, e) a 25 °C e incubados durante 15 días. Esporodocios (a), macroconidios con célula basal en forma de pie (b), conidios en parejas (c), polifiálide (d), clamidosporas (e).

### *F. solani*

Las colonias de *F. solani* crecidas en PDA y en CLA presentaron pigmentaciones variables (incoloras, crema-blanco, blancuzca, marrón-pálidas, grisáceas-azuladas). Las colonias presentaron bordes regulares, el color del anverso fue blanco-grisáceo (PANTONE 420) mientras el reverso fue naranja pálido (PANTONE 164), con ausencia de líquido de transpiración (figura 23). La velocidad de crecimiento promedio de los aislados fue de 4,6 mm.d<sup>-1</sup>.

En relación con estos resultados Leslie y Summerell (2006) señalaron que las colonias de *F. solani* sobre PDA producen pigmentaciones variables sobre el agar, cuyos colores varían desde incoloras a blanco-crema, blanquecinos, violetas, carmelita pálido, grisáceas a ligeramente azuladas. Asimismo ellos plantean que la textura de las colonias generalmente

es escasa o dispersa, constituida por micelio de color blanco cremoso, lo cual fue similar a lo observado en algunos de los aislados obtenidos en el presente estudio.

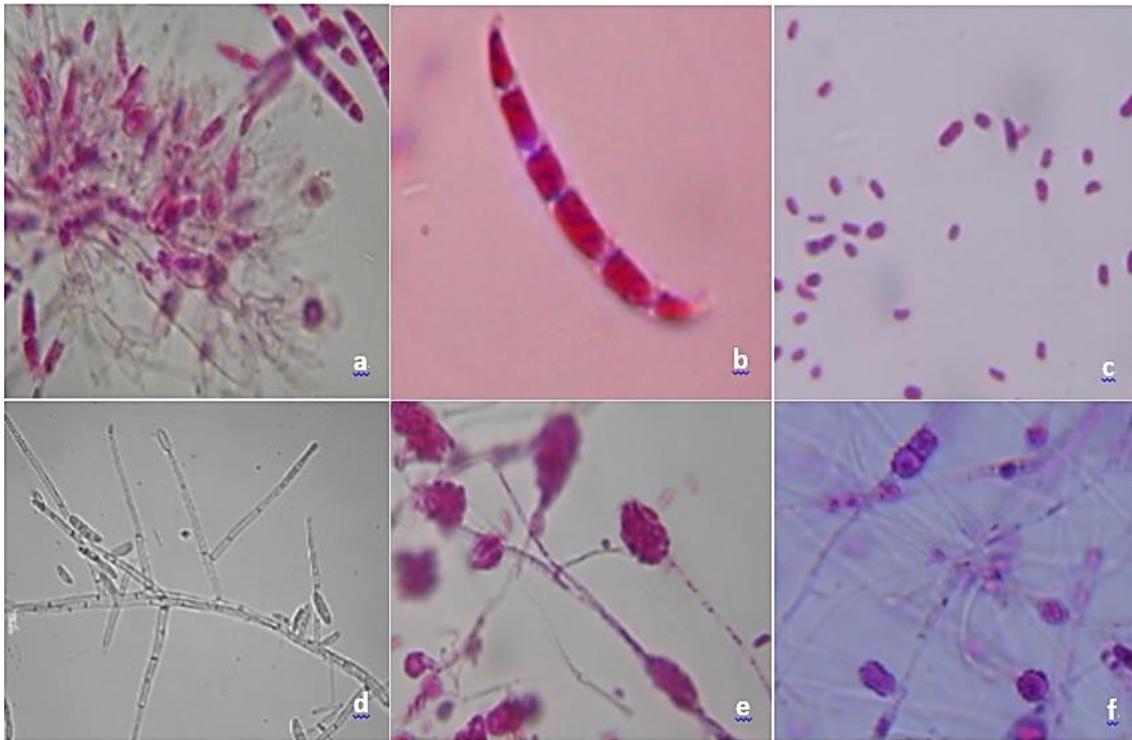


**Figura 23.** Morfología de la colonia de *F. solani* crecida en el medio de cultivo PDA (Scharlau) a 25 °C e incubada durante 8 días. Color del anverso de la colonia (a), color del reverso de la colonia (b).

Los aislados de *F. solani* produjeron abundantes macroconidios (figura 24 b) con formas curvadas y relativamente anchas (26,05  $\mu\text{m}$  de largo x 5,09  $\mu\text{m}$  de ancho), la célula apical de los macroconidios fueron ligeramente en forma de gancho y engrosadas. La célula del pie de los macroconidios mostró formas melladas o de pie.

De 3-7 correspondió el número de septos, aunque fueron más frecuentes 3-4 septos en los macroconidios observados. La presencia de esporodocios se observó en todos los aislados (figura 24 a). Los microconidios (12,51  $\mu\text{m}$  de largo x 5,01  $\mu\text{m}$  de ancho) (figura 24 c), se formaron en falsas cabezas (figura 24 e) con formas oval, elipsoidal y reniformes, de 0-2 septos. Las células conidiógenas formaron monofiálides largas (figura 24 d).

Las clamidosporas (7,15  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio) fueron simples, agrupadas en parejas o en cadenas cortas (figura 24 f). Las características culturales y morfológicas mencionadas anteriormente, fueron similares a las descritas por Ronquillo *et al.* (2013) y las informadas por Leslie y Summerrell (2006).

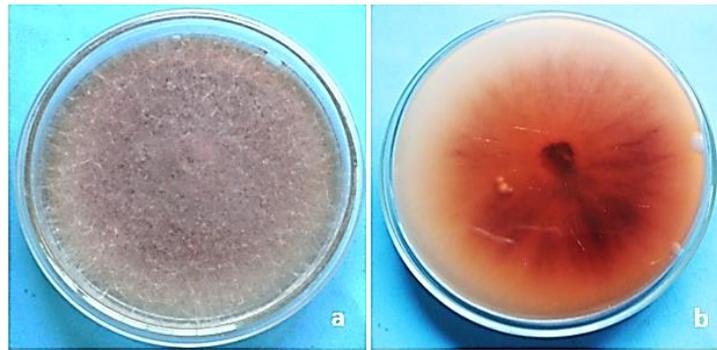


**Figura 24.** Caracteres morfológicos de aislados de *F. solani* crecidos en el medio de cultivo CLA (a, b, c) y SNA (d, e, f) a 25 °C e incubadas durante 15 días. Esporodocios (a), macroconidios (b), microconidios (c), monofiálides alargadas (d), falsas cabezas (e) y clamidosporas (f).

### *F. subglutinans*

Las colonias de *F. subglutinans* crecidas en PDA y en CLA presentaron pigmentaciones variables (incoloras a violeta pálido, gris-violeta, violeta, violeta oscuro y magenta). El color del anverso fue gris (PANTONE 430) mientras el reverso fue violeta rojizo (PANTONE 180), con ausencia de líquido de transpiración (figura 25). La velocidad de crecimiento micelial radial fue de 2,87 mm.d<sup>-1</sup>.

Los macroconidios (29,27 µm de largo x 2,77 µm de ancho) de los aislados de *F. subglutinans* fueron largos, delgados a ligeramente curvados, con paredes paralelas. La célula apical fue cónica a ligeramente curvada (figura 26 a, d). La célula del pie de los macroconidios fue curvada o en forma de pie. Los macroconidios presentaron de 3-7 septos aunque fueron más frecuentes aquellos que tenían 3-5 septos.



**Figura 25.** Morfología de la colonia de *F. subglutinans* crecida en el medio de cultivo PDA (Scharlau) a 25 °C e incubada durante 8 días. Color del anverso de la colonia (a), color del reverso de la colonia (b).

La célula conidiógena formó polifiálides y monofiálides (figura 26 c, e, f). No se observaron clamidosporas, aunque sí se observaron en algunos aislados de esta especie abultamientos hifales. Los microconidios (8,87  $\mu\text{m}$  de largo x 2,85  $\mu\text{m}$  de ancho), presentaron formas oval, elipsoidal y reniforme con 0-2 septos formados en falsas cabezas (figura 26 c, g). Las características culturales y morfológicas descritas son similares a las referidas por Booth (1971) y por Nelson *et al.* (1983).

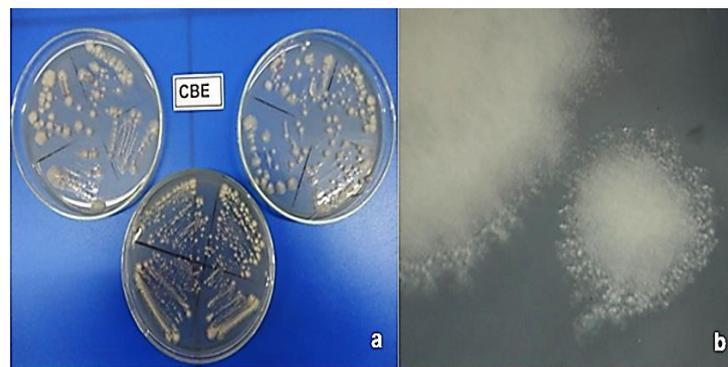


**Figura 26.** Caracteres morfológicos de aislados de *F. subglutinans* crecidos en el medio de cultivo CLA (a, d) y SNA (b, c, e, f, g) a 25 °C e incubadas durante 15 días. Macroconidios (a, d), falsas cabezas (b, c), monofiálides ramificadas (e), monofiálides (f), microconidios (g).

#### 4.2.2 Caracterización cultural, morfológica y bioquímica de las bacterias asociadas

##### Caracterización cultural

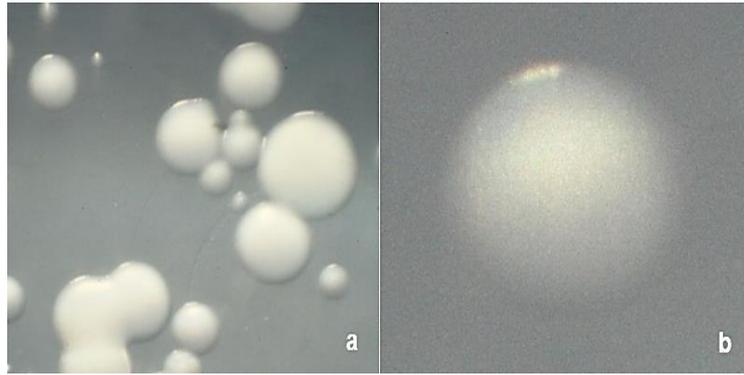
Algunos aislados bacterianos obtenidos (C-53, CE-1 y CE-2), mostraron colonias de un color blanco grisáceo-cremoso, brillosas, ligeramente levantadas, con bordes irregulares difusos, ligeramente translúcidas que fueron observadas a simple vista a partir de las 24 horas de sembradas (figura 31).



**Figura 31.** Colonias crecidas en medio Agar Nutriente, que mostraron color blanco cremoso, planas, con bordes irregulares difusos. Observación a simple vista (a) y bajo estereoscopio con 40 X (b).

Sin embargo, otros aislados bacterianos (C-17 y C-50) mostraron colonias redondeadas de color blanco grisáceas a blanco cremoso, redondo, ligeramente elevado y con bordes lisos a ondulados, ligeramente translúcidas. En el medio de cultivo PDA, algunas colonias de estos aislados al cabo de una semana mostraron forma de huevo frito, al tener una apariencia umbonada con bordes ondulados (figura 32).

Las características de las colonias de los aislados C-53, CE-1 y CE-2, fueron similares en la forma de las colonias, el color, la elevación, a lo descrito por Makhlouf y Abdeen (2014), quienes obtuvieron diferentes aislados bacterianos a partir de tubérculos de papa con síntomas de pudrición blanda. Asimismo, los caracteres de las colonias de los aislados del presente trabajo se asemejaron en la forma, el crecimiento mucoso y la capacidad de crecer a 36 °C con los aislados bacterianos obtenidos por Ali *et al.* (2014), causantes de la pata prieta y la pudrición blanda de tubérculos de papa.



**Figura 32.** Colonias bacterianas crecidas en medio Agar Nutriente, con formas circulares, de color blanco, elevadas y bordes completamente lisos. Observación a simple vista (a) y bajo estereoscopio con 40 X (b).

Por otra parte, nuestros resultados fueron similares a los referidos por Ronquillo (2012), quien obtuvo aislados bacterianos del género *Erwinia*, asociados con síntomas de PC de la palma de aceite en Ecuador.

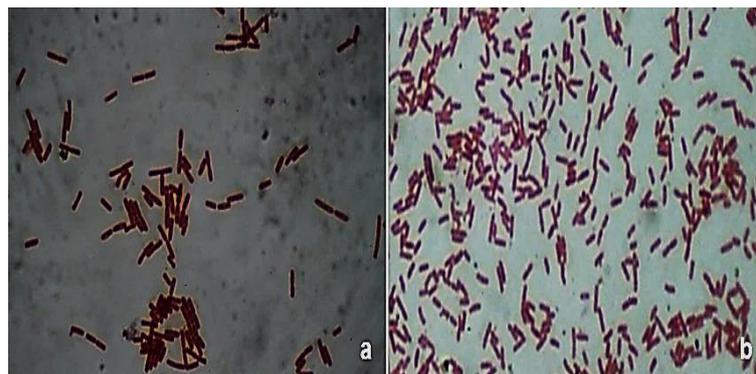
En relación con las colonias de los aislados C-17 y C-50, los mismos mostraron similitud con las características observadas en cepas del género *Erwinia*, causantes de la pudrición en collar del rizoma de plantas de bananos de 8-12 semanas de edad en la India (Nagrle *et al.*, 2013). Asimismo, se observó coincidencia entre las características anteriormente mencionadas y las referidas por Rahman *et al.* (2012), quienes obtuvieron aislados de *Erwinia* spp., cuyas colonias mostraron colores, elevación, bordes y velocidad de crecimiento a 36 °C, similares a la de nuestros aislados. Sin embargo, estos autores utilizaron como material vegetal para el aislamiento tubérculos de papa con pudrición blanda, mientras nuestros aislados procedían de muestras de palma de aceite con PC.

Finalmente, Abdalla (2001) logró identificar aislados de *Erwinia* spp., que mostraron colonias blanco cremosas en medio de cultivo PDA, con crecimiento umbonado y márgenes ondulados, similar a un huevo frito, lo cual fue similar a lo obtenido en nuestro estudio para los aislados C-17 y C-50, con la diferencia de que estos últimos se aislaron a partir de plantas de palma de aceite con síntomas de PC.

### **Caracterización morfológica**

Todos los aislados bacterianos fueron Gram negativos con forma de bastoncitos unicelulares, rectos y Gram negativos. Frecuentemente se agruparon en parejas, y con menos frecuencia formaron cadenas cortas (figura 33).

En relación con los caracteres morfológicos mencionados anteriormente, encontramos semejanza con los referidos por Végh *et al.* (2013), quienes refirieron que bacterias pertenecientes al género *Erwinia* por sus formas bacilares o bastoncitos cortos (0,5-1 x1-3  $\mu\text{m}$ ), pueden presentarse solos, agrupados en parejas o en cadenas cortas, Gram negativos, con motilidad debido a flagelación períttrica. Sin embargo, en nuestro trabajo a pesar de encontrar motilidad en todos los aislados bacterianos obtenidos, no se pudo constatar mediante información visual la presencia de flagelos períttricos.



**Figura 33.** Forma de bastoncitos, unicelulares, rectos y Gram negativos, agrupados en parejas y cadenas. Aislado procedente de colonias color blanco cremosas, planas, con bordes irregulares difusos (a). Aislado procedente de colonias de color blanco, elevadas y bordes completamente lisos (b).

Ronquillo (2012) obtuvo aislados bacterianos del género *Erwinia* spp., asociados con la PC de la palma de aceite en Ecuador. Según las características culturales y morfológicas observadas, nuestros aislados mostraron similitud con lo informado para el género *Erwinia*, lo cual sentó las bases para efectuar una caracterización basada en sus propiedades bioquímicas.

**Caracterización bioquímica**

Los aislados bacterianos asociados con la PC de la palma de aceite, fueron anaerobios facultativos (en algunos aislados fue pobre el crecimiento). Estos provocaron la pudrición de rodajas de papa, debido a la actividad pectinolítica positiva de los mismos. Por otra parte, los aislados C17, C50 y C53 fueron sensibles a la Eritromicina y no crecieron en NaCl 5 %; mientras los aislados CE-1 y CE-2 fueron resistentes a este antibiótico y crecieron en la solución salina. Todos los aislados no produjeron compuestos reductores a partir de sacarosa. Solo los aislados CE1 y CE2 produjeron ácido a partir de lactosa. Todos crecieron a 36 °C (tabla 8). Sobre la base de los resultados que aparecen resumidos en la tabla 8, se concluyó que los aislamientos bacterianos C17, C50, C53, CE1 y CE2 se correspondieron con el género *Erwinia*.

**Tabla 8.** Resumen de las pruebas bioquímico-fisiológicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas asociadas con la pudrición del cogollo en *E. guineensis*.

Pruebas	<i>Erwinia</i>				
	C17	C50	C53	CE1	CE2
Forma	b	b	b	b	b
Gram	-	-	-	-	-
Crecimiento a 36 °C	+	+	+	+	+
Compuesto reductores a partir de la sacarosa	-	-	-	-	-
Producción ácido a partir lactosa	-	-	v	+	+
Producción de indol	-	-	-	-	-
Oxidativo/Fermentativo (O/F)	F	F	F	F	F*
Pigmentos fluorescentes (King B)	-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	+	+	+
Pudrición de rodajas de papa	+	+	+	+	+*

b= bacilo; v = variable; + = positivo; - = negativa; \* mayor actividad pectinolítica y fuerte actividad fermentativa

Las características bioquímico y fisiológicas de los aislados obtenidos en el presente estudio, mostraron semejanza con lo informado por Czajkowski *et al.* (2015). La actividad pectinolítica observada en nuestros aislados fue similar a la referida por Ngadze *et al.* (2012) al inocular rodajas de papa. Por otra parte, la sensibilidad a la Eritromicina observada en nuestros aislados bacterianos fue similar a la obtenida por Cheon y Jeon (2014).

Las bacterias del género *Erwinia*, causantes de pudrición blanda, se han clasificado en varias especies y subespecies según criterios moleculares, bioquímicos y en relación con el rango de hospedante que afectan (Lelliot y Dickey 1984; Gallois *et al.*, 1992; Hélias *et al.*, 1998). Según las pruebas bioquímicas evaluadas, nuestros aislados bacterianos mostraron similitud con el género *Erwinia*.

#### **4.2.3 Identificación molecular de los agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite**

La identificación basada en criterios culturales y morfológicos, coincidió con los criterios moleculares correspondientes a las secuencias que abarcaron desde la región ITS1 hasta la región ITS 4. *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *F. proliferatum* correspondieron a los aislados 0112, 063, y 0712, respectivamente (Tabla 9). Los aislados 080 y X3F no pudieron ser secuenciados.

**Tabla 9.** Identificación molecular de los aislados de *Fusarium*, asociados con plantas de *E. guineensis* híbrido Coarí x La Mé con síntomas de PC, mediante el análisis tipo BLAST de las secuencias correspondientes a la región ITS1 e ITS4, por comparación con secuencias archivadas en el Banco genético [GenBank].

Criterios culturales y morfológicos	Código	Criterios moleculares	Homología [%]	Accesión
<i>Fusarium oxysporum</i>	0112	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	EU236709.1
<i>Fusarium solani</i>	063	<i>Fusarium solani</i>	100	KF624788.1
<i>Fusarium proliferatum</i>	0712	<i>Fusarium proliferatum</i>	99	HF930594.1

Por otra parte, respecto a la región 1 $\alpha$ -TEF, los aislados 0112, 063, 080, 0712 y X3F se observó correspondencia entre la identificación basada en criterios culturales y morfológicos con los criterios moleculares; lo cual permitió identificarlos como: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium sacchari* (E. J. Butler) W. Gams, *Fusarium proliferatum* y *FIESC*, respectivamente (Tabla 10).

**Tabla 10.** Identificación molecular de los aislados de *Fusarium*, asociados con plantas de *E. guineensis* y del híbrido Coarí x La Mé con síntomas de PC, mediante el análisis tipo BLAST de las secuencias correspondientes a la región 1 $\alpha$ -TEF al compararlas con las secuencias depositadas en las bases de datos *Fusarium* ID.

Criterios culturales y morfológicos	Código	Criterios moleculares	Homología [%]	Accesión
<i>Fusarium oxysporum</i>	0112	<i>Fusarium oxysporum</i>	99,52	NRRL 38885
<i>Fusarium solani</i>	063	<i>Fusarium solani</i>	100	NRRL 32720
<i>Fusarium subglutinans</i>	080	<i>Fusarium sacchari</i>	99,52	NRRL 13999
<i>Fusarium proliferatum</i>	0712	<i>Fusarium proliferatum</i>	99	FD 01379
<i>Fusarium semitectum</i>	X3F	<i>FIESC</i>	92,44	NRRL 3214

Nota: FIESC significa complejo *Fusarium incarnatum-equiseti* (del inglés *Fusarium Incarnatum-Equiseti* Species Complex)

Las técnicas moleculares en numerosas especies fúngicas, resultan necesarias para la identificación de aquellas que pueden confundirse si solamente se toman en cuenta los criterios culturales y morfológicos (Boonham *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio existió correspondencia entre los resultados de la identificación derivada de los criterios culturales y morfológicos, así como los resultados obtenidos en el análisis molecular mediante las regiones ITS y la correspondiente al factor de elongación transcripcional 1 $\alpha$ -TEF.

En este sentido, Arif *et al.* (2012) combinaron el uso de criterios morfológicos y moleculares (basados en la región ITS), para la identificación de 12 aislados de *Fusarium* causantes de la enfermedad Bakane en plantas de arroz; y encontraron correspondencia entre dichos criterios, lo cual permitió identificar a *F. proliferatum* como agente causal de la enfermedad. A diferencia de estos autores que solamente utilizaron la región ITS, en nuestro trabajo se usó dicha región de conjunto con la región 1- $\alpha$  TEF. En el presente trabajo también se observó correspondencia entre los criterios morfológicos y moleculares.

En este sentido, Dubey *et al.* (2013) desarrollaron marcadores moleculares basados en las regiones del ADN: 1 $\alpha$ -TEF,  $\beta$ -tubulina e ITS. Estos marcadores fueron sensibles para detectar *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, agente causal de la marchitez del garbanzo en la India. A diferencia de estos autores, en nuestro trabajo solamente utilizamos las regiones ITS y 1 $\alpha$ -TEF; sin embargo, se pudo verificar la coincidencia entre los aislados de *F. oxysporum* al tomar en consideración los criterios culturales, morfológicos así como el análisis de las secuencias correspondientes a dichas regiones.

Acorde con O'Donnell *et al.* (2009), se requiere realizar análisis moleculares que integren varias regiones del ADN, para clasificar la posición filogenética de algunas especies de *Fusarium*, que aún no han sido identificadas con mayor claridad. Según estos autores los marcadores moleculares de regiones: IGS (del inglés, inter-genic spacer), la región ITS del ADN ribosomal (del inglés, RNA encoding genes o rDNA), el factor de elongación transcripcional 1 $\alpha$ -TEF, genes que codifican para: poligalacturonasas, la región del ADN mitocondrial, grupos de apareamiento sexual, fosfato permeasas,  $\beta$ -tubulina, nitrato reductasas pueden ser candidatos promisorios para identificar y diagnosticar molecularmente especies del género *Fusarium*. Sin embargo, actualmente se prefieren para realizar análisis filogenético las regiones 1 $\alpha$ -TEF e IGS (O'Donnell *et al.*, 2009).

Los miembros del complejo de especies de *F. oxysporum* (del inglés, *Fusarium oxysporum* species complex o FOOSC), constituye uno de los grupos de especies fitopatógenas de mayor importancia económica con una amplia distribución de especies del género *Fusarium*. Los representantes de este complejo pueden afectar a más de 130 especies de plantas. Se han reconocido cerca de 100 formas especiales (f. sp.) y razas de *F. oxysporum*, lo cual ilustra su enorme importancia fitopatológica (Armstrong, 1981).

El uso combinado de características morfológicas, culturales y moleculares para la clasificación de *F. solani*, ha sido utilizado por Chehri *et al.* (2014) para identificar 45 aislados de *Fusarium*, causantes de pudriciones de tubérculos de papa en Irán. Estos autores utilizaron las regiones 1 $\alpha$ -TEF así como ITS para diferenciar a 45 aislados del género *Fusarium* procedentes de tubérculos con síntomas de pudrición. A pesar de que en nuestro trabajo los aislados fueron obtenidos a partir de palma de aceite y que solamente se utilizó la región 1 $\alpha$ -TEF, se logró observar correspondencia entre los criterios morfológicos, culturales y moleculares.

*F. solani*, es un nombre que ha sido aplicado ampliamente a lo que actualmente se conoce como complejo de especies de *F. solani* (del inglés, *Fusarium solani* Species Complex o FSSC) (O'Donnell, 2000). Las especies que agrupa este complejo son habitantes del suelo, colonizan restos vegetales y otros sustratos de origen animal y vegetal y pueden ser causantes de importantes enfermedades en humanos (Booth, 1971). Algunas especies saprófitas como *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. tucumaniae* y *F. virguliforme* forman parte de este complejo (Aoki *et al.*, 2003). Las especies fitopatógenas generalmente causan pudriciones de raíces y pudrición del pie de la planta.

*F. sacchari* y *F. concentricum* en la actualidad se consideran similares morfológicamente a *F. subglutinans*, por ello varios autores en el pasado agrupaban esta especie en *F. subglutinans sensu lato*. Sin embargo, algunas especies pertenecientes al complejo *F. subglutinans sensu lato*, en la actualidad han cambiado su nombre según nuevos resultados obtenidos mediante análisis filogenéticos, mediante marcadores moleculares y con la determinación de la compatibilidad sexual de sus poblaciones (Lima *et al.*, 2009). Sin embargo acorde con los resultados obtenidos en el presente trabajo es el primer informe para Ecuador de la presencia de *F. subglutinans* asociado con la PC en palma de aceite.

Nuestros resultados mostraron que la región 1- $\alpha$  TEF fue útil para identificar a 5 especies diferentes de *Fusarium*, lo cual fue similar a los resultados de Hsuan *et al.* (2011).

*F. semitectum* es un patógeno común en países tropicales y subtropicales, frecuentemente reconocido como un patógeno débil o patógeno de heridas de tejidos vegetales. Esta especie ha sido frecuentemente informada como causante de daños en maní durante almacenamiento, en frutos de banana, cítrico, tomate, cucurbitáceas (Booth, 1971), y

ajonjolí, pero nunca había sido informado asociado con plantas de la palma de aceite con PC.

Una vez conocida la etiología de la PC en San Lorenzo, se podrían evaluar fungicidas comerciales o sus ingredientes activos para determinar cuáles de ellos son más efectivos en la inhibición del crecimiento micelial o en la inhibición de la germinación conidial, sobre la base de ensayos de susceptibilidad *in vitro*, mediante la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) para cada producto y con ello apoyar la toma de decisión para utilizar en campo los productos más efectivos.

En este acápite mediante la secuenciación de las regiones ITS y del factor de elongación 1- $\alpha$  TEF, se identificaron las especies: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. semitectum*, lo cual coincidió con los criterios culturales y morfológicos evaluados. Al culminar con la identificación molecular, se pudo conocer con certeza la identidad de los agentes asociados con la PC en San Lorenzo, Ecuador, lo cual será de gran importancia para evaluar la patogenicidad de los aislados y cumplir con los postulados de Koch.

#### **4.3 Evaluación patogénica de agentes asociados con la pudrición del cogollo de la palma de aceite**

Al inocular *F. oxysporum* (aislado 0112) en plantas de 4 meses de edad de *E. guineensis* y del híbrido O x G, se observó clorosis en las hojas jóvenes cercanas al paquete de flechas, seguido de un amarillamiento progresivo de las mismas. En la raíz, y en la base de la raíz, se observó necrosis así como necrosis descendente de la flecha en las plantas inoculadas de ambos genotipos (figura 34).



**Figura 34.** Síntomas causados por *F. oxysporum* (aislado 0112) sobre plantas de palma de aceite del híbrido O x G y *E. guineensis* de 4 meses de edad en vivero. Clorosis alrededor de la flecha en plantas del híbrido O x G (a), necrosis descendente de la flecha en plantas del híbrido O x G (b), necrosis a nivel de raíz en plantas de híbrido O x G (c), clorosis alrededor de la flecha en plantas de *E. guineensis* (d), necrosis descendente de la flecha en plantas de *E. guineensis* (e) y necrosis a nivel de raíz en plantas de *E. guineensis* (f).

Por otra parte, *F. proliferatum* (aislado 0712) causó clorosis de las hojas jóvenes cercanas al paquete de flechas, seguido de un amarillamiento progresivo de las mismas. Finalmente, esta especie produjo necrosis descendente de la flecha y PC tanto en *E. guineensis* como en el híbrido O x G (figura 35).

El aislado bacteriano E2, perteneciente al género *Erwinia* que fue seleccionado para el primer ensayo de patogenicidad (en base a la mayor actividad pectinolítica y la fuerte actividad fermentativa, descritas en el acápite 4.2.2), no reprodujo síntomas de la PC, por ello fue descartado para ensayos posteriores de inoculación.



**Figura 35.** Síntomas causados por *F. proliferatum* (aislado 0712) sobre plantas de palma de aceite del híbrido O x G y en *E. guineensis* de 4 meses de edad en vivero. Clorosis alrededor de la flecha en plantas del híbrido O x G (a), necrosis descendente de la flecha en plantas del híbrido O x G (b), necrosis a nivel de raíz en plantas del híbrido O x G (c), clorosis alrededor de la flecha en plantas de *E. guineensis* (d), necrosis descendente de la flecha en plantas de *E. guineensis* (e), necrosis a nivel de raíz en plantas de *E. guineensis* (f).

Al inocular la raíz con el método de aspersión, *F. oxysporum* causó clorosis en el 100 % de las plantas inoculadas tanto en *E. guineensis* como en el híbrido O x G. Asimismo, se observó necrosis de raíces en el 80 % de las plantas de *E. guineensis* y de un 100 % en el híbrido O x G. Finalmente, la necrosis en la base de las raíces se detectó en el 13.33 % de las plantas de *E. guineensis* así como en el híbrido O x G.

Por otra parte, la inoculación a las raíces mediante aspersión + daño mecánico, *F. oxysporum* causó clorosis en el 100 % de *E. guineensis* y en el híbrido O x G; asimismo provocó necrosis en raíces del 93,33 % de las plantas de *E. guineensis* y el 100 % del híbrido O x G. Por último, este hongo fitopatógeno causó necrosis en la base de las raíces del 20 % de las plantas de *E. guineensis* y un 26,66 % del híbrido O x G.

En relación con *F. proliferatum*, cuando se inocularon las raíces mediante aspersión, se observó clorosis en el 100 % de las plantas inoculadas de *E. guineensis* y del híbrido O x G; a su vez se determinó un 70 % de necrosis en raíces de las plantas de *E. guineensis*, mientras que en el híbrido O x G fue del 93,33 %. Este hongo fitopatógeno, no causó necrosis en la base de las raíces de *E. guineensis* ni del híbrido O x G.

Con la inoculación de las raíces mediante aspersión + daño mecánico, *F. proliferatum* causó clorosis en el 100 % de las plantas de *E. guineensis* y del híbrido O x G. Asimismo, se observó necrosis de las raíces en el 93,33 % de las plantas de *E. guineensis* y del 100 % del híbrido O x G. Finalmente, en *E. guineensis* no se obtuvo necrosis en la base de raíces; mientras en las plantas del híbrido O x G sólo se evidenció un 6,66 %.

Cuando se realizó la inoculación de *F. oxysporum* a la flecha mediante aspersión sin daño mecánico, se observó clorosis en el 100 % de las plantas de *E. guineensis*, así como del híbrido O x G. A su vez, este hongo fitopatógeno causó necrosis en la flecha del 6,66 % de *E. guineensis* y del híbrido O x G. Por otra parte, *F. proliferatum* provocó clorosis en el 100 % de las plantas inoculadas de *E. guineensis*, así como del híbrido O x G. Asimismo, este microorganismo ocasionó necrosis de la flecha en el 6,66 % de las plantas inoculadas de *E. guineensis* y del híbrido O x G.

En relación con el método de inoculación mediante aspersión + daño mecánico en la flecha, *F. oxysporum* causó clorosis en el 100 % de las plantas de *E. guineensis* y del híbrido O x G, así como necrosis de la flecha en el 6,66 % de las plantas de *E. guineensis* y en el híbrido O x G. Sin embargo, *F. proliferatum* provocó clorosis en el 100 % de las plantas de *E. guineensis* y del híbrido O x G; a su vez causó necrosis de la flecha en el 13,33 % de las plantas inoculadas de *E. guineensis*, así como en el híbrido O x G.

Con el método de punción, *F. oxysporum* causó clorosis en el 100 % de las plantas de *E. guineensis* y del híbrido O x G, asimismo ocasionó necrosis de la flecha en el 13,33 % de las plantas de *E. guineensis* y en el híbrido O x G. Por otra parte, *F. proliferatum* provocó clorosis en el 100 % de las plantas de *E. guineensis* y del híbrido O x G; así como necrosis de la flecha en el 20 % de las plantas inoculadas de *E. guineensis* mientras que en el híbrido fue de 13,33 %.

No existieron diferencias en la respuesta de *E. guineensis* y del híbrido O x G en el primer ensayo de inoculación. Los métodos de inoculación: aspersión + carborundum y punción, fueron los que permitieron un desarrollo más uniforme de los síntomas en las plantas inoculadas. Asimismo, como no se observaron síntomas de marchitez ni epinastia, se decidió utilizar para el segundo ensayo de inoculación solamente la flecha. En esta zona se observaron lesiones necróticas en la flecha, así como necrosis descendente en el primer ensayo.

En el segundo ensayo de inoculación, además de los aislados 0112 y 0712, se incluyeron los aislados 063, 080 y X3, los cuales mediante la caracterización basada en criterios culturales, morfológicos y moleculares (según lo descrito en el acápite 4.2.1.2), se identificaron como *F. solani*, *F. subglutinans* y *F. semitectum*, respectivamente. *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, causaron lesiones necróticas típicas del inicio de la PC, similar a lo observado en campo. Por otra parte, *F. solani* y *F. semitectum* causaron puntos necróticos y algunas lesiones necróticas (figura 36).

En investigaciones de CENIPALMA, se determinó que en palmas de vivero se presentaron síntomas, comparables a los de la PC reconocida en estadios tempranos en palmas adultas. Así se manifestó necrosis de los folíolos en uno de los lados de la hoja más joven; amarillamiento del tercio superior de la misma, pudrición y debilitamiento de las nuevas flechas a la altura del cogollo (Martínez y Torres, 2007).

Según De Franqueville (2001), los primeros síntomas de la PC se caracterizan por una clorosis en las hojas jóvenes cercanas a la flecha. Además, las plantas con manifestación de síntomas más avanzados pueden presentar retraso en su crecimiento (Louise *et al.*, 2007).

En plantas adultas la sintomatología se presenta con clorosis en las hojas jóvenes, amarillamiento de los folíolos desde la base hacia la parte distal, pudrición de la base de la flecha y acumulación de flechas pegadas y cerradas. Además, se observó colapso y doblamiento de las hojas jóvenes así como pudrición (con colores anaranjado-amarillo-café rojizo); la cual se extendió hasta alcanzar el meristema (Bastidas, 2006).



**Figura 36.** Necrosis de la flecha en plantas de *E. guineensis* causadas por *F. oxysporum* (a) y *F. proliferatum* (b). Necrosis descendente de la flecha en plantas de *E. guineensis* causadas por *F. oxysporum* (c) y *F. proliferatum* (d). Lesiones necróticas en la flecha de plantas de *E. guineensis*, provocadas por *F. subglutinans* (e). Puntos necróticos aislados en la flecha de plantas de *E. guineensis* ocasionados por *F. solani* (f) y *F. semitectum* (g). Necrosis de la flecha en plantas del híbrido Coarí O x G, causadas por *F. oxysporum* (h) y *F. proliferatum* (i). Lesiones necróticas en flechas del híbrido Coarí O x G, causados por *F. solani* (j).

En las plantas del híbrido O x G así como en *E. guineensis*, se observó correspondencia de los síntomas observados en vivero con aquellos registrados en campo, a pesar de que en condiciones de vivero la evolución de los síntomas fue más rápida.

*F. oxysporum* se identificó como agente fitopatógeno ya que fue capaz de producir decoloración vascular en los peciolo de las hojas, así como en el cogollo de plantas de palma de Canarias (*Phoenix canariensis*) en California, al inocular plantas con suspensiones conidiales (Feather *et al.*, 1985). A diferencia de nuestro trabajo, estos autores utilizaron plantas de solo 3 meses de edad y de otra especie; mientras que en nuestro ensayo se utilizaron plantas de 4 meses de edad de *E. guineensis*, así como plantas del híbrido O x G.

Asimismo, en nuestra experiencia *F. oxysporum* causó daños a nivel de flecha, raíces y base de raíces, a diferencia de los autores anteriores que observaron síntomas solamente en la parte aérea.

Asimismo, Flood *et al.* (1993) utilizó suspensiones conidiales de *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis*, aplicadas a la base de plantas de palma de aceite, para comparar la virulencia de tres aislados africanos con un aislado brasileño. Estos autores demostraron que ambas especies eran patogénicas; pero los aislados brasileños fueron más agresivos en las líneas de palma de aceite inoculadas. La presencia de clorosis y necrosis en las hojas se corresponde con los resultados de estos autores, a pesar de no observar ni marchitez ni epinastia en nuestros resultados en vivero.

Para seleccionar material de palma de aceite resistente a la marchitez causada por *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis*, se requiere seleccionar aislados patogénicos y agresivos. A diferencia de nuestro trabajo, Flood *et al.* (1993) evaluaron la altura de la planta y la producción de materia seca del sistema radical, lo que demuestra que ambas variables se redujeron en las plantas inoculadas en relación con las plantas sanas. Otra diferencia radicó en que en nuestro ensayo no se observaron síntomas de marchitez como se han referido para *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis*.

Por otra parte, Flood (2006) refirió que *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* causó dos tipos de síntomas en palma de aceite: el primero se caracterizó por una marchitez súbita de la planta la cual condujo a la muerte inmediata, en cuestión de pocas semanas; mientras que la infección crónica afectó las plantas, pero estas permanecieron vivas durante varios meses e incluso años. En nuestros ensayos de inoculación solo se observaron síntomas crónicos a los 5 meses posteriores a la inoculación artificial con *F. oxysporum*, pero no se observó marchitez.

En relación con *F. solani*, autores como Ronquillo *et al.* (2013) prefirieron utilizar plantas de palma de aceite de solo dos meses de edad, las cuales fueron inoculadas con una suspensión conidial de  $10^7$  conidios mL<sup>-1</sup>. Los primeros síntomas se caracterizaron por pequeñas manchas necróticas en las hojas más jóvenes, las cuales fueron observadas a los cuatro días posteriores a la inoculación (dpi); mientras a los 27 dpi se observó pudrición de la yema del cogollo. Sin embargo, a diferencia de estos autores, en nuestros ensayos se

utilizaron plantas de 4 meses de edad, donde los primeros síntomas de clorosis en hojas jóvenes se observaron a los 45 dpi, y la presencia de pequeñas lesiones necróticas a los 180 dpi meses posteriores a la inoculación.

Asimismo, Suwandi y Kondo (2012) a pesar de haber logrado la reproducción de síntomas de las flechas en plantas de palma de aceite en Indonesia, al inocular *F. solani*, los mismos fueron diferentes de los que se detectaron en condiciones de campo. Estos autores concluyeron que esta especie fúngica no fue la causante de la pudrición común de la flecha. A diferencia de estos autores, en nuestras inoculaciones se observaron síntomas de clorosis de las hojas jóvenes, pero no se logró reproducir la fase de PC ni la necrosis del paquete de flecha, lo cual sí fue observado en condiciones de campo. Quizás porque en vivero sólo se evaluó hasta los 6 meses posteriores a la inoculación y posiblemente se requiera de más tiempo para observar estos síntomas.

Respecto a la especie *F. subglutinans*, en la literatura revisada solo Ochoa y Bustamante (1974), consideraron a esta especie como patógena potencial de la PC en palma de aceite. Sin embargo, estos autores no realizaron inoculaciones artificiales ni reprodujeron los postulados de Koch para verificar su hipótesis. En nuestro estudio se observó clorosis generalizadas en las hojas jóvenes y lesiones necróticas en los tejidos de la flecha en *E. guineensis* en el segundo ensayo de inoculación. Por otra parte, en Colombia se asoció la PC de la palma de aceite con *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *F. solani* y *Thielaviopsis* sp (Nieto, 1993), pero este autor no cumplió con los postulados de Koch para confirmarlo.

Viswanathan *et al.* (2012), determinaron mediante la inoculación artificial de una suspensión de conidios de *F. subglutinans* sobre la variedad Co 86032, que este hongo fitopatógeno causó la marchitez en caña de azúcar en la India. Igualmente, este microorganismo ha sido señalado como el agente causal de deformaciones de frutos en el cultivo del mango (Kumar *et al.*, 2013).

Asimismo Kumar *et al.* (2013) identificaron a esta especie fúngica como causante de deformaciones en la sección longitudinal de la yema apical de plantas de mango, lo que provocó engrosamiento en yemas vegetativas, malformaciones en las partes florales, pérdida de la dominancia apical, brotación de yemas adventicias, proliferación de nuevas hojas,

flores e hipertrofia de los ejes de las panículas, lo cual comprometió la productividad de la planta.

En relación con la especie *F. proliferatum*, como causante de síntomas, Abdalla *et al.* (2000), encontraron a este hongo fitopatógeno asociado con la marchitez súbita y la muerte regresiva de la palma datilera. El mismo, fue recuperado a partir de fragmentos de raíces y hojas de plantas enfermas. Estos autores, al igual que en nuestro trabajo, utilizaron el método de inyección de una suspensión conidial. En nuestra experiencia la infección de *F. proliferatum* produjo necrosis de la flecha, clorosis y amarillamiento foliar, sin causar síntomas de marchitez; a diferencia de los resultados de los autores anteriormente señalados. Otro aspecto diferente en nuestros resultados, consistió en que logramos cumplir con todos los postulados de Koch, mientras estos autores no pudieron reproducirlos en su totalidad.

Hameed (2012) identificó a *F. proliferatum* como causante de la pudrición de la inflorescencia de la palma datilera en el sur de Iraq. Este autor, a diferencia de nuestros ensayos, utilizó la inoculación a las espatas de la inflorescencia y logró observar pudrición en las mismas, pero no a nivel de la flecha y las hojas que la rodearon. Sin embargo, en nuestro trabajo se ensayó con plantas juveniles, donde no se observaron inflorescencias. Asimismo, en nuestros ensayos de patogenicidad de esta especie fúngica, se apreciaron lesiones a nivel de la flecha y del paquete de flecha, las cuales tenían la apariencia de pequeñas manchas necróticas y provocaron una pudrición descendente sin llegar al meristema.

Por otra parte, Hafizi *et al.* (2013) lograron aislar a *F. proliferatum*, a partir de muestras de tejido enfermo de palma de aceite, asociado con síntomas de PC en Indonesia. Estos autores no comprobaron los postulados de Koch, solo demostraron que esta especie estaba asociada a los síntomas descritos para esta enfermedad. Asimismo, Suwandi y Kondo (2012) identificaron a numerosas especies del género *Fusarium* asociadas con la pudrición de la flecha en palmas aceiteras. Estos autores lograron mediante ensayos de inoculación artificial, reproducir síntomas similares a los obtenidos en el presente trabajo al inocular *F. proliferatum* en plantas de 3-5 y 10-12 meses de edad, respectivamente. Por otra parte, lograron cumplir con todos los postulados de Koch al igual que en nuestra experiencia. Sin embargo, en nuestro ensayo de inoculación se utilizaron plantas de 4 meses de edad y en condiciones de vivero.

De igual modo, este hongo fitopatógeno pudiera estar vinculado con interacciones multitróficas insecto-planta-hongo. En relación con este aspecto, Khudhair *et al.* (2014) plantearon que *F. proliferatum* puede ser transmitido por el escarabajo *Oryctes elegans* Prell. en la palma datilera; ellos consideraron a este insecto como un vector potencial de este hongo fitopatógeno, pues se han observado larvas y adultos en este cultivo. El estado larval de este coleóptero puede alimentarse de la corona y del margen del estípite, donde puede utilizar tejido vivo o muerto. El estado adulto prefiere minar la base del racimo de frutos, alimentándose del tejido vivo. Este aspecto es de vital importancia para el manejo de este patógeno en el cultivo de palma de aceite ya que este insecto ha sido informado en este cultivo (Rochat *et al.*, 2004).

*F. proliferatum* ha sido diagnosticado como un agente fitopatógeno común en cultivos como arroz (Kushiro *et al.*, 2012), cebolla (Carrieri *et al.*, 2013), banana (Zeng *et al.*, 2013), espárrago (Elmer, 2014), ajo (Quesada-Ocampo *et al.*, 2014), tomate (Saseetharan *et al.*, 2014), maíz (Fumero *et al.*, 2015), entre otros. *F. semitectum* se ha asociado como agente fitopatógeno de cultivos como: alfalfa (Zaccardelli *et al.*, 2006), fruta del dragón con pulpa roja (Hawa *et al.*, 2010) y algodón (El-Samawaty *et al.*, 2013). Solamente Hafizi *et al.* (2013) sugirieron que este agente fitopatógeno está asociado con la palma de aceite; sin embargo estos autores realizaron solo una caracterización morfológica y molecular de los aislados obtenidos, pero no realizaron ensayos de inoculación artificial ni cumplieron con los postulados de Koch. De este modo, nuestros resultados constituyen el primer informe de la patogenicidad de *F. proliferatum* en palma de aceite.

Por otra parte, Oliveira *et al.* (2014) informaron a *F. semitectum* como agente causal de la pudrición corchosa de frutos de melón, sin realizar inoculaciones artificiales ni cumplir con los postulados de Koch, pues solamente observaron el desarrollo de los síntomas en condiciones de campo. En este mismo cultivo, Shekari *et al.* (2006) propusieron a *F. semitectum* como el agente causal de la marchitez de posturas del cultivo del melón.

Por vez primera, *Fusarium proliferatum* y *F. subglutinans* se informan como nuevas especies causantes de necrosis de la flecha del cultivo de la palma de aceite en San Lorenzo, provincia Esmeraldas, Ecuador. Además, se confirmó que la PC para esta región estuvo causada por un complejo de especies de *Fusarium*, en el cual *F. oxysporum* y *F. proliferatum*

reprodujeron con mayor uniformidad y similitud los síntomas observados en condiciones de campo.

La inoculación del aislado bacteriano CE2, no reprodujo síntomas de la PC en las plantas de palma de aceite inoculadas. En la literatura consultada, en palma de aceite no se encontraron informes relacionados con la presencia de bacterias fitopatógenas causantes de la PC. Resultados similares fueron referidos por Monge *et al.* (1993), quienes sugirieron que *Erwinia* spp., conjuntamente con varias especies de *Fusarium*, fueron los microorganismos que con mayor frecuencia se aislaron a partir de tejidos de palma de aceite con síntomas de pudrición común de la flecha. Sin embargo, estos autores no lograron reproducir los síntomas en plantas inoculadas a pesar de haber realizado ensayos de inoculación artificial.

Según Duff (1963) la pudrición de la yema de la palma de aceite comprende la pudrición de las hojas internas, que conduce a la destrucción de la yema acompañada de desintegración de tejidos y de un olor fétido hacia la parte central del cogollo. Este autor asoció estos síntomas con *Erwinia carotovora*, *Erwinia* spp., y *Erwinia herbicola*. Asimismo, sugirió que esta enfermedad ocurre de modo esporádico en las principales regiones del mundo en las cuales se cultiva palma de aceite, principalmente en el Congo, en donde ha causado la muerte de un gran número de plantas. Sin embargo, este autor no reprodujo los postulados de Koch con las bacterias anteriormente mencionadas. Otros autores han informado a *Serratia marcescens* causante del decline súbito y la muerte de la yema de la palma de aceite en diferentes localidades del mundo (Chase y Broschat, 1991).

Por otra parte, Abdalla (2001) informó a *E. chrysanthemi* como una nueva especie fitopatógena en palma datilera, causante del decline súbito de este cultivo en la región de Al-Qassin en Arabia Saudita. Este autor, utilizó la técnica de aspersión e infusión del inóculo bacteriano bajo condiciones de presión reducida. Solo con este último método pudo reproducir la sintomatología en plantas susceptibles del cv Succary. En relación con este resultado, en nuestro estudio solo se utilizó el método de aspersión foliar e inyección, sin que se evidenciaran síntomas de PC ni marchitez en las plantas inoculadas de palma de aceite.

Una vez efectuada la caracterización de los agentes asociados con la PC de la palma de aceite, pudimos constatar que los aislados de *Fusarium* obtenidos, según las características de sus colonias, así como morfológicas y diagnóstico molecular, se correspondieron con las especies *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. semitectum*. Por otra parte, se identificaron aislados bacterianos del género *Erwinia* a partir de los caracteres de sus colonias, la morfología y pruebas bioquímicas para este género.

En relación con la caracterización patogénica, *F. oxysporum* reprodujo síntomas de necrosis en la flecha, necrosis en raíces y en la base de la raíz, así como clorosis y amarillamiento progresivo en las hojas jóvenes y necrosis en los folíolos; sin llegar a observarse marchitez ni epinastia. *F. subglutinans*, *F. solani* y *F. semitectum* causaron lesiones necróticas en la flecha. Sin embargo, *F. proliferatum* y *F. oxysporum* provocaron pudrición descendente de la flecha.

Con la escala evaluativa y el uso de variables relacionadas con la tasa de infección se podría determinar la agresividad de las especies que conforman el complejo *Fusarium* causante de la PC en San Lorenzo. Adicionalmente, dentro de cada especie se podrían seleccionar los aislados más agresivos como posibles candidatos para usarlos como agentes selectivos. Por último, sería interesante evaluar la inoculación mediante combinaciones de las especies de *Fusarium* para determinar si existen relaciones sinérgicas o antagónicas entre ellas durante la infección de las plantas de palma de aceite inoculadas artificialmente.

Con el uso de PCR- cuantitativo se podría determinar cuáles de las especies del complejo *Fusarium* colonizan más rápido y en mayor proporción los tejidos de la palma de aceite, lo cual permitiría determinar la progresión de la biomasa de cada especie en el tiempo y con ello dilucidar las especies que mayor peso tienen en la sintomatología y el desarrollo de la PC.

Respecto a la identificación de los agentes causales de la PC en palma de aceite y la caracterización integrada basada en criterios culturales, morfológicos, bioquímicos, moleculares y patogénicos, *F. proliferatum* y *F. oxysporum* fueron identificados como causantes de clorosis, amarillamiento y necrosis descendente de la flecha. *F. proliferatum* constituye el primer informe de esta especie como causante de la PC en palma de aceite. Además *F. oxysporum* provocó necrosis de las raíces y en la base de raíces, mientras

*F. proliferatum* produjo necrosis en la raíz. *F. subglutinans*, *F. solani* y *F. semitectum* provocaron puntos necróticos aislados en las flechas. La identificación de este complejo de especies, causantes de síntomas de la PC de la palma de aceite, permitirá en el futuro desarrollar alternativas de manejo de esta enfermedad en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador.

## **5. CONCLUSIONES**

1. La sintomatología de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en San Lorenzo de conjunto con la magnitud de los daños observados, evidenció la presencia de la forma aguda.
2. Se elaboró una escala evaluativa según la sintomatología observada en San Lorenzo, la cual permitió determinar la intensidad de ataque en las empresas palmicultoras.
3. *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. semitectum* causaron lesiones necróticas en la flecha, mientras solo *F. proliferatum* y *F. oxysporum* provocaron pudrición descendente.
4. Con los resultados obtenidos se pueden desarrollar alternativas de manejo de esta enfermedad en San Lorenzo.

## **6. RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios epifitológicos de la pudrición del cogollo en condiciones de campo para el monitoreo de la enfermedad y apoyar su manejo.
2. Determinar la respuesta del germoplasma de palma de aceite en Ecuador, mediante el uso de la escala de evaluación confeccionada en el trabajo, para seleccionar materiales tolerantes y/o resistentes a la pudrición del cogollo.
3. Realizar ensayos de inoculación con la combinación de las principales especies patogénicas y evaluar la magnitud de los daños, así como determinar la agresividad de las mismas.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbas, H. K., Mirocha, C. J., Kommedahl, T., Vesonder, R. F., y Golinski, P. (1989b). Production of trichothecene and non-trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species isolated from maize in Minnesota. *Mycopathologia*, 108(1), 55-58.

Abbas, H. K., Mirocha, C. J., Meronuck, R. A., Pokorny, J. D., Gould, S. L., y Kommedahl, T. (1988). Mycotoxins and *Fusarium* spp., associated with infected ears of corn in Minnesota. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1930-1933.

Abbas, H. K., Mirocha, C. J., y Gunther, R. (1991). Production of zearalenone, nivalenol, moniliformin, and wortmannin from toxigenic cultures of *Fusarium* obtained from pasture soil samples collected in New Zealand. *Mycotoxin Research*, 7, 53-60.

Abdalla, M. Y. (2001). Sudden decline of date palm trees caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Disease*, 85(1), 24-26.

Abdalla, M. Y., Al-Rokibah, A., Moretti, A., y Mulé, G. (2000). Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease*, 84(3), 321-324.

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Department of Plant Pathology University of Florida. (Fifth Edition). USA. Elsevier Academic Press.

AGROCALIDAD y ANCUPA. (2015). Resultados del Informe Censo de Plantaciones de Palma Aceitera afectadas por la Pudrición de Cogollo en la Provincia de Esmeraldas. Memoria Técnica. San Lorenzo. 24 p.

Akbar, A., Ahmad, M., Khan, S. Z., y Ahmad, Z. (2015). Characterization of the causal organism of Soft Rot of tomatoes and other Vegetables and Evaluation of its Most Aggressive Isolates. *American Journal of Plant Sciences*, 6(4), 511-517.

Aldana de la Torre, R. C., Aldana de la Torre, J. A., y Moya, O. M. (2010). Biología, hábitos y manejo de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Boletines técnicos*, (23), 56. *Cenipalma*, Bogotá.

## *Referencias bibliográficas*

Aldana, R. y Moya, O. (2010b). Manejo del picudo: *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae): *Boletín Técnico* 23, Segunda impresión. Bogotá. *Cenipalma*. 47 p.

Ali, H. F., Bibi, A., Ahmad, M., Junaid, M., Ali, A., Hussain, S., y Alam, S. (2014). Characterization of the causal organism of blackleg and soft rot of potato, and management of the disease with balanced fertilization. *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2277-2284.

Aljanabi, S. M. y Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692-4693.

Allen, W., Paulus, A., Van Gundy, S., Swinburne, T. R., Ollagnier, M., y Renard, J. L. (1995). Report on the mission to Ecuador. Palmeras del Ecuador-Palmoriente. 13th-20th February 1995. Document Cirad-Cp, 1995, 99 p.

Alvarado, A., Escobar, R., y Henry, J. (2013). El híbrido OxG Amazon: una alternativa para regiones afectadas por pudrición de cogollo en Palma de aceite. *Revista Palmas*, 34 (No. especial, Tomo I), 305-314.

ANCUPA y AGROCALIDAD. (2013). Guía de Campo sobre la Pudrición de Cogollo. Departamento de Investigación de Ancupa y Dirección Sanidad Vegetal de Agrocalidad. Memoria Técnica sobre PC. Edición 2013. Quito. Ecuador. 26 p.

ANCUPA. (2010). Estadísticas Nacionales de Palma Africana. Disponible en <http://www.ancupa.com/index93d8.html?option=comCONTENT&VIEW=ARTICLE&ID=73&ITEMID=103>. 2010. (Consultado: 24-02-2014).

ANCUPA. (2011). Ancupa señala que la enfermedad de pudrición de cogollo ha afectado apenas al 2,41 % de cultivos de palma en los últimos 5 años y que la producción no está amenazada. Disponible en <http://www.ancupa.com>. (Consultado: 10-01-2014).

ANCUPA. (2014a). Plan de Acción contra la PC. *Revista Palma*. Edición 25 pp 8-14.

ANCUPA. (2014b). Ecuador País Palmicultor. *Revista Palma*. Edición Especial 23, pp, 32-41.

ANCUPA. (2015). Conocimiento, Tecnología, Productividad. Sanidad Vegetal. Módulo IV. [CD-Room]. Memorias del III Congreso Nacional de Investigación de Palma Aceitera. Santo Domingo de Los Tsáchilas. Ecuador. 15-17 abril de 2015.

Aoki, T., O'Donnell, K., Homma, Y., y Lattanzi, A. R. (2003). Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex - *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia*, 95(4), 660-684.

Arias, N. A., Beltrán, J. A., Guerrero, J. M., y Sánchez, A. C. (2014). Tecnologías para el manejo de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite validadas en las zonas palmeras de Colombia. *Revista Palmas*, 35(2), 39-52.

Arif, M., Chawla, S., Zaidi, NW., Rayar, J. K., Variar, M., y Singh, U. S. (2012). Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor 1 $\alpha$ -TEF gene. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 444-447.

Armstrong, G. M. y Armstrong, J. K. (1981). Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En, P. E. Nelson, T. A. Toussoun, and R. J. Cook. (Eds). *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. (pp. 391-399). Pennsylvania State University Press. USA.

Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J., Cigelnik, E., Kroon, L. P., Roebroeck, E. J., y Waalwijk, C. (2000). Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90(8), 891-900.

Bachy, A. (1954). Contribution á l'étude de la pourriture du coeur du palmier á huile. *Oléagineux*, 9(8-9), 619-627.

## *Referencias bibliográficas*

Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P., y Leslie, J. F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4039-4043.

Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z., A. y Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS one*, 3(10), 33-76.

Balmas, V.; Santori, A., y Corazza, L. (2000). Le specie di *Fusarium* piú comuni in Italia. Suggestimenti per il loro riconoscimento. Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale. Petria, *Giornale di Patologia delle Piante*. Roma Vol. 10, Suppl.1. 60 p.

Barba, J. y Baquero, Yeseña. (2013). Híbridos OxG obtenidos a partir de oleíferas Taisha Palma del Río (PDR), Ecuador. Variedad-PDR (Taisha x Avros). *Revista Palmas*, 34 (No. Especial, Tomo I), 315-325.

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. ASP Press.

Bastidas, E. y Enríquez, G. (2008). Caracterización morfológica de palmas de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) enfermas con pudrición de cogollo en la zona palmera occidental. Tesis Ingeniero Agrónomo y Forestal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño. Colombia. 78 p.

Bastidas, Romania. (2006). Proyecto de prefactibilidad para la implementación de un cultivo de palma africana en el Cantón San Lorenzo. Provincia de Esmeraldas. Facultad de Ciencias Económicas y Negocios de la Universidad Tecnológica Equinoccial. Tesis Ingeniería en Mercadotecnia. Quito. 170 p.

Benson, J. H. (1998). *Microbiological Applications. Laboratory Manual In General Microbiology*. Seventh Edition. USA, Pasadena City College. Printed by MCGraw-Hill Companies.

Bernal, F. (2001). El Cultivo de la Palma de Aceite y su Beneficio. Guía general para el nuevo palmicultor. *Fedepalma y Cenipalma*. pp. 17-18.

## Referencias bibliográficas

- Bernal, F. y Almonacid Sandra. (2006). El cultivo de la palma de aceite. Generalidades sobre la Industria. Departamento de Transferencia de Tecnología de Ancupa. Conferencia presentada en el I Módulo del Seminario Taller sobre Manejo de Plantaciones de Palma Aceitera. Disponible en <http://www.pdf4free.com>. (Consultado: 15-12-2014).
- Bernal, G. (2012). Situación de la PC en el Ecuador. Memorias de una Conferencia en el Foro de Agricultura Sostenible. Facultad Recursos Naturales, ESPOCH. junio, 2012. Riobamba-Ecuador.
- Bernal, G. (2014). Plan de Acción contra la PC. Breve Historia de la Pudrición del cogollo en el Ecuador. *Revista Palma*, Edición 25, 20-23.
- Bezuidenhout, A. y Fakier, K. (2006). Maria's Burden: Contract Cleaning and the Crisis of Social Reproduction in Post-apartheid South Africa. *Antipode*, 38(3), 462-485.
- Boonham, N., Glover, R., Tomlinson, J. y Mumford, R. (2008). Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. In *Sustainable disease management in a European context* (pp. 355-363). Springer. Netherlands.
- Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew; Surrey England: Printed in Great Britain by the Eastern Press Limited.
- Borrero, C. (2006). Cultivo de la Palma de Aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Disponible en: [http://borrerosesar.wikispaces.com/file/view/PALMA+DE+ACEITE+\(RESUMEN\).pdf](http://borrerosesar.wikispaces.com/file/view/PALMA+DE+ACEITE+(RESUMEN).pdf) (Consultado: 03-04-2014).
- Buitrago, V. y Nieto, L. E. (1995). Hongos asociados con pudriciones de la flecha y cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en los Llanos Orientales. *Revista Palmas*, 16(4), 9-17.
- Carrieri, R., Raimo, F., Pentangelo, A., y Lahoz, E. (2013). *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. *Crop Protection*, 43, 31-37.

## Referencias bibliográficas

Castellanos, G., Jara, C., y Mosquera, G. (2011). Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*, 375, 12-14.

Chang, K. F., Hwang, S. F., Conner, R. L., Ahmed, H. U., Zhou, Q., Turnbull, G. D., y Gossen, B. D. (2015). First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada. *Crop Protection*, 67, 52-58.

Chase, A. R. y Broschat, T. K. (1991). Diseases and disorders of ornamental palms. *American Phytopathological Society*. USA. 56 p.

Chávez, F. (1986). Enfermedades de palma africana en Ecuador y su combate. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Ecuador. Estación Experimental Santo Domingo. Manual No. 8. 18 p.

Chehri, K., Ghasempour, H. R., y Karimi, N. (2014). Molecular phylogenetic and pathogenetic characterization of *Fusarium solani* species complex (FSSC), the cause of dry rot on potato in Iran. *Microbial pathogenesis*, 67, 14-19.

Chelkowski, J., Zawadzki, M., Zajkowski, P., Logrieco, A., y Bottalico, A. (1990). Moniliformin production by *Fusarium* species. *Mycotoxin Research*, 6(1), 41- 45.

Cheon, W. y Jeon, Y. H. (2014). First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Causing Soft Rot of *Orostachys japonica* in Korea. *Plant Disease*, 98(7), 989-989.

Chinchilla, C. (1989). Principales enfermedades de la Palma Aceitera. United Brans Oil Palm, División ASD. Costa Rica. 13 p.

Chinchilla, C. (2008). Las muchas caras de las pudriciones del cogollo y la flecha seca en palma aceitera y la importancia de un enfoque integral para su manejo. *ASD Oil Palm Papers*. 32, 1-25.

Chinchilla, C. (2010). Las pudriciones del cogollo en palma aceitera: la complejidad del desorden y una guía de convivencia. *ASD*. Costa Rica, pp. 1-23.

## *Referencias bibliográficas*

- Chinchilla, C. M. y Durán, N. (1999). Nature and management of Spear Rot-like problem in oil palm: a case study in Costa Rica. In 1999 PORIM International Palm Oil Congress, *Agriculture, Kuala Lumpur, MY*, 29, 97-126.
- Ciarepro. (2013). Carta colores Ral Pantone. Disponible en <http://www.ciarepro.es/index.html>. (Consultado: 23-08-2013).
- CIRAD. (2009). "All you need to know about oil palm". Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement. Disponible en: <http://www.cirad.fr/en/publications-resources/science-for-all/the-issues/oil-palm/what-you-need-to-know/botany>. (Consultado: 22-05-2014).
- Condeelis, J. (1995). Elongation factor 1 $\alpha$  translation and the cytoskeleton. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(5), 169-170.
- Cooper, R. M. (2011). *Fusarium* wilt of oil palm: A continuing threat to south East Asian Plantations. *The Planter*, 87(1023), 409-418.
- Corley, R. H. V. y Tinker, P. (2003a). The Climate and Soils of the Oil Palm. In, *The Oil Palm*. 4th Edition. (pp. 71-88). Blackwell Science Publishing Ltda. Oxford, UK.
- Corley, R. H. V. y Tinker, P. B. (2003b). Diseases and Pest of the Oil Palm. Diseases of the Bud or Stem Apex. In, *The Oil palm*. 4th.edition. (pp. 416-417). Blackwell Science Ltda. Oxford. UK.
- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York. Columbia University Press.
- Crous, P.W., Gams, W., Stalpers, V., Robert, V., y Stegehuis, G. (2004). Mycobank: Fungal database nomenclature and species banks online taxonomic novelties submission. Disponible en: <http://www.mycobank.com/MycoTaxo.aspx> Donald, CE, Ribeiro OK. 1996. (Consultado: 15-01-2014).

## *Referencias bibliográficas*

- Czajkowski, R., de Boer, W. J., van Veen, J. A., y Van der Wolf, J. M. (2012). Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. Biovar 3 *in vitro* and *in plant*. *Plant Pathology*, 61(1), 169-182.
- De Franqueville, H. (2001). La Pudrición del cogollo de la Palma Aceitera en América Latina. Revisión preliminar de logros y hechos alcanzados. Departamento de Cultivos Perennes. *CIRAD*, pp, 3-35.
- De Franqueville, H. (2003). Oil Palm Bud Rot in Latin America. Cambridge University Press. United Kingdom. *Experimental Agriculture*, 39(03), 225-240.
- Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium* Mycotoxins. Chemistry, Genetics and Biology. St Paul, MN. *The American Phytopathological Society*. 260 p.
- Dhingra, O. y Sinclair, J. (1995). Basic Plant Pathology Methods. Second Edition *CRC* Lewis Publishers.
- Dickey, R. S. (1979). *Erwinia chrysanthemi*: a comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. *Phytopathology*, 69(4), 324-329.
- Dollet, M. (1991). Etiología de la Pudrición de Cogollo. Investigaciones Viroológicas conducidas por el IRHO. *Revista Palmas*, 12(2), 33-37.
- Dubey, S. C., Priyanka, K., y Upadhyay, B. K. (2014). Development of molecular markers and probes based on 1 $\alpha$ -TEF,  $\beta$ -tubulin and ITS gene sequences for quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by using real-time PCR. *Phytoparasitica*, 42(3), 355-366.
- Duff, A. (1963). The bud rot little leaf disease of the oil palm. *J. West African Institute. Oil Palm Research*, 4(14), 174-190.
- Dye, D. W (1981). A numerical taxonomic study of the genus *Erwinia*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 24(2), 223-229.

## Referencias bibliográficas

- Dzido, J. L., Genty, P., e Ollagnier, M. (1978). Les principales maladies du palmier á huile en Equator. *Oléagineux*, 33(2), 55-63.
- Elliot, M. (2009). Oil Palm Diseases in Ecuador: PC Comparison with Colombia. *Summary Trip Report*. University of Florida-IFAS, 16 p.
- Elmer, W. H. (2014). Management of *Fusarium* crown and root rot of asparagus. *Crop Protection*, 73, 2-6.
- El-Samawaty, A. E. R., Yassin, M. A., Moslem, M. A., y Omar, M. R. (2013). Effectiveness of Some Plant Extracts against *Fusarium* spp., Causing Cotton Seedlings Damping-off. *Life Science Journal*, 10(4), 510-515.
- Fairhurst, T. y Hardter, R. (2012). Palma de aceite: Manejo para Rendimientos Altos y Sostenibles. Quito. Primera Edición. Editores *IPNI*, 404 p.
- FAO. (2013). Documento de proyecto revisión de la norma Codex San 210, para aceites vegetales especificados, para la adición del aceite de palma con contenido elevado de ácido oleico (OXG). Disponible en: [http://ftp.fao.org/Codex/Meetings/ccfo/ccfo23/fo23\\_08s.pdf](http://ftp.fao.org/Codex/Meetings/ccfo/ccfo23/fo23_08s.pdf). (Consultado: 28-05-2014).
- Feather, T. V., Ohr, H. D., Munnecke, D. E., Carpenter, J. B., Dixon, W. N., Foltz, J. L., y Kahn, H. E. (1985). The occurrence of *Fusarium oxysporum* on *Phoenix canariensis*, a potential danger to date production in California. *Plant Disease*, 73(1), 78-80.
- FEDAPAL. (2014). Exportaciones de aceite crudo de palma por exportador del Ecuador, año 2014. Disponible en <http://fedapal.com/web/index.php/joomla/estadisticas-nacionales.html> (Consultado: 20-02-2015).
- Figuroa, M. y Chávez, F. (1984). Determinación de agente causal de la pudrición de la flecha de la palma africana en el Ecuador. INIAP, Ecuador. Boletín Técnico No. 53. 7 p.
- Flood, J. (2006). A review of *Fusarium* wilt of oil palm caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*. *Phytopathology*, 96(6), 660-662.

## Referencias bibliográficas

- Flood, J., Mepsted, R., Velez, A., Paul, T., y Cooper, R. M. (1993). Comparison of virulence of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* from Africa and South America. *Plant Pathology*, 42(2), 168-171.
- Fumero, M. V., Reynoso, M. M., y Chulze, S. (2015). *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* isolated from maize in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 86-92.
- Gagkaeva, T. Y. y Yli-Mattila, T. (2004). Genetic diversity of *Fusarium graminearum* in Europe and Asia. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* (pp. 551-562). Springer. Netherlands.
- Gallois, A., Samson, R., Ageron, E., y Grimont, P. A. (1992). *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*, associated with odorous soft rot of chicory (*Cichorium intybus* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(4), 582-588.
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., y Samson, R. (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium betavasculorum* and *Pectobacterium wasabiae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 381-391.
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., y O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* (pp.473-479). Springer Netherlands.
- Gerlach, W. y Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium* a Pictorial Atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*. 209 p.
- Gómez, P. L., Ayala, L., y Munévar, F. (2000). Characteristics and management of Bud rot, a disease of oil palm. *Plantation tree crops in the new millennium: the way ahead*, 1, 545-553.

## Referencias bibliográficas

- González-Jaen, M. T., Mirete, S., Patiño, B., Lopez-Errasquin, E., y Vázquez, C. (2004). Genetic markers for the analysis of variability and for production of specific diagnostic sequences in fumonisin-producing strains of *Fusarium verticillioides*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6), 525-532.
- Gurjar, G., Barve, M., Giri, A., y Gupta, V. (2009). Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia*, 101(4), 484-495.
- Hafizi, R., Salleh, B., y Latiffah, Z. (2013). Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 959-968.
- Hameed, M. A. (2012). Inflorescence Rot Disease of Date Palm caused by *Fusarium proliferatum* in Southern Iraq. *African Journal of Biotechnology*, 11(35), 8616-8621.
- Hawa, M. M., Salleh, B. y Latiffah, Z. (2010). Characterization and Intraspecific Variation of *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel) associated with red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 9(3), 273-284.
- Hélias, V., Le Roux, A. C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J. P., y Jouan, B. (1998). Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology*, 104(7), 685-699.
- Hsuan, H. M., Salleh, B. y Zakaria, L. (2011). Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6722-6732.
- Hugh, R. y Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 66, 24-26.

INIAP. (2011). Programa Nacional de Palma Africana, Documento electrónico: Disponible en [http://www.iniap.gob.ec/~iniapgob/sitio/index.php?option=com\\_content&view=article&id=24:palma-africana&catid=6:programas](http://www.iniap.gob.ec/~iniapgob/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=24:palma-africana&catid=6:programas). (Consultado: 24-01-2015).

Jímenez, O. (1991). Pudrición del cogollo en la palma aceitera en la región de Tumaco-Colombia. *Revista Palmas*, 12(2), 45-48.

Khudhair, M., Melloy, P., Lorenz, D. J., Obanor, F., Aitken, E., Datta, S., y Chakraborty, S. (2014). *Fusarium* crown rot under continuous cropping of susceptible and partially resistant wheat in microcosms at elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Pathology*, 63(5), 1033-1043.

King, E. O., Ward, M. K., y Raney, D. E. (1958). Factors affecting development of bacterial stem rot of pelargonium. *Phytopathology*, 48, 185-191.

Knutsen, A. K., Torp, M., y Holst-Jensen, A. (2004). Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *International Journal of Food Microbiology*, 95(3), 287-295.

Konstantinova, P. y Yli-Mattila, T. (2004). IGS-RFLP analysis and development of molecular markers for identification of *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium kyushuense*. *International Journal of Food Microbiology*, 95(3), 321-331.

Kovachich, W. G. (1956). Patch yellow disease of the oil palm. *Transactions of the British Mycological Society*, 39(4), 427- 430.

Kristensen, R., Gauthier, G., Berdal, K. G., Hamels, S., Remacle, J., y Holst-Jensen, A. (2007). DNA microarray to detect and identify trichothecene-and moniliformin-producing *Fusarium* species. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 1060-1070.

Kumar, P., Kamle, M., Gupta, V. K., Pandey, B. K., Misrha, A. K. y Modi, D. R. (2013). Host Pathogen Interaction Study in Malformed Affected Tissues of *Mangifera indica* L. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 8(3), 199-210.

## Referencias bibliográficas

- Kushiro, M., Saitoh, H., Sugiura, Y., Aoki, T., Kawamoto, S. I., y Sato, T. (2012). Experimental infection of *Fusarium proliferatum* in *Oryza sativa* plants; fumonisin B 1 production and survival rate in grains. *International Journal of Food Microbiology*, 156 (3), 204-208.
- Láday, M., Juhász, A., Moretti, A., Szécsi, A., y Logrieco, A. (2004a) Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). *European Journal of Plant Pathology*, 110,545–550.
- Laing, D. (2010). Causa de la pudrición de cogollo en la palma de aceite. Papel del calcio en una hipótesis abiótica-edáfica. *Memorias del XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo*. Santo Domingo, Ecuador. 17 -19 noviembre 2010. 25 p.
- Laing, D. (2009). La Causa de la Pudrición de Cogollo (PC) en Palma de Aceite: Hipótesis Abiótica-Edáfica. Conferencia presentada en el Centro Internacional de Agricultura Tropical. Costa Rica. junio. 113 p.
- Langevin, F., Eudes, F., y Comeau, A. (2004). Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology*, 110(7), 735-746.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., y Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lee, R. C. y Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862-864.
- Lelliott, R. A. y Dickey, R. S. (1984). Genus VII. *Erwinia*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 469-476.
- Lelliott, R. A. y Stead, D. E. (1987). Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. *Methods in Plant Pathology*, Volumen 2, Series editor: T F Preece. Published on behalf of the *British Society for Plant Pathology* by Blackwell Scientific Publications.

## *Referencias bibliográficas*

- Leslie, J. F. y Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Photographs by Suzanne Bullock. Blackwell Publishing.
- Lievens, B., Claes, L., Vakalounakis, D. J., Vanachter, A.C. y Thomma, B.P., (2007). A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radiciscucumerinum*. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2145-2161.
- Lima, C. S., Pfenning, L. H., Costa, S. S., Campos, M. A., y Leslie, J. F. (2009). A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil. *Plant Pathology*, 58(1), 33-42.
- Logrieco, A., Altomare, C., Moretti, A., y Bottalico, A. 1992. Cultural and toxigenic variability in *Fusarium acuminatum*. *Mycological Research*, 96(6), 518-523.
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., KostECKI, M., Golinski, P., Ritieni, A., y Chelkowski, J. (1998a). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied Environmental Microbiology*, 64(8), 3084–3088.
- López, G. (2010). Pudrición del cogollo, Marchitez sorpresiva, Anillo rojo y Marchitez letal en la palma de aceite en América Latina. *Revista Palmas*, 12, 57-67.
- Louise, C., Amblard, P., de Franqueville, H., Benavides, D., y Gallardo, C. (2007). Investigaciones dirigidas por el CIRAD sobre las enfermedades del complejo pudrición del cogollo de la palma aceitera en Latinoamérica. *Revista Palmas*. 28 (Tomo I Ed. Especial), 345-362.
- Mach, R. L., Kullnig-Gradinger, C. M., Farnleitner, A. H., Reischer, G., Adler, A., y Kubicek, C. P. (2004). Specific detection of *Fusarium langsethiae* and related species by DGGE and ARMS-PCR of a  $\beta$ -tubulin (tub1) gene fragment. *International Journal of Food Microbiology*, 95(3), 333-339.

- Makhlouf, A. H. (2014). Investigation on the Effect of Chemical and Biological Control of Bacterial Soft Root Disease of Potato in Storage. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(10), 31-44.
- Marasas, W. F. O., van Rensburg, S. J., y Mirocha, C. J. (1979). Incidence of *Fusarium* species and the mycotoxins, deoxynivalenol and zearalenone, in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 27(5), 1108-1112.
- Martínez G. L. (2010). Pudrición del cogollo, Marchitez sorpresiva, Anillo rojo y Marchitez letal en la palma de aceite en América. *Revista Palmas*, 31(1), 43-53.
- Martínez, G., Sarria, G. A., Torres, G. A., Aya, H. A., Ariza, J. G., y Rodríguez, J. (2008a). Microorganismos asociados a la Pudrición del cogollo de la palma de aceite y su inoculación en palmas de vivero. *Revista Palmas*, 29(3), 19-30.
- Martínez, G., Sarria, G. A., Torres, G. A., Ayala, H. A., Ariza, J. G., y Rodríguez, J. (2008b). *Phytophthora* sp., es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite en Colombia. *Revista Palmas*, 29(3), 31-41.
- Martínez, L. y Torres, G. (2007). Presencia de la Pudrición de Cogollo de la palma de aceite (PC) en palmas de vivero. *Revista Palmas*, 28(4), 13-20.
- Martínez, L., Sarria, G., Torres, G., Varon, F. Romero, A., y Sanz, S. (2010). Avances en la investigación de *Phytophthora palmivora*, el agente causal de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Revista Palmas*, 31(1), 55-63.
- Mirete, S., Vázquez, C., Mulé, G., Jurado, M., y González-Jaén, M. T. (2004). Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1a sequence analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6), 515-523.
- Mirocha, C. J., Abbas, H. K., Kommedahl, T., y Jarvis, B. B. (1989a). Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccaris* sp. from Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 254-255.

## Referencias bibliográficas

- Misrha, P. K., Fox, R. y Culham, A. (2003). Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters*, 218(2), 329-332.
- Monge, J. E., Chinchilla, C., y Wang, A. (1993). Studies on the aetiology of the Crown Disease Spear Rot Syndrome in oil palm. Costa Rica. *ASD Oil Palm Papers*, 7, 1-16.
- Mulé, G., Susca, A., Stea, G., y Moretti, A. (2004). A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6), 495-502.
- Muñoz, A. (2011). Palma Africana en el Ecuador. Editora Agritec.com. Quito, Ecuador. Disponible en <http://www.agritec.com> (Consultado: 26-02-2014).
- Muslim, S. N., AL Kadmy, I. M., Mahammed, A. N., Musafer, H. K., y Muslim, S. N. (2015). Detection of the Optimal Conditions for Pectate lyase Productivity and Activity by *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Medical and Bioengineering*, 4(3), 184-191.
- Nagrale, D. T., Borkar, S. G., Gawande, S. P., Mandal, A. K., y Raut, S. A. (2013). Characterization of a bacterial collar and rhizome rot of banana (*Musa paradisiaca*) caused by strains of *Erwinia chrysanthemi* pv. *paradisiaca*. *Journal of Applied and Natural Science*, 5(2), 435-441.
- Nazerian E., Sijam K., Ahmad, Z. A. M., y Vadamalai, G. (2013). Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as a new disease on Lettuce in Malaysia. *Australasian Plant Disease Notes*, 8(1), 105–107.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., y Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press. USA.
- Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T. A., y Van der Waals, J. E. (2012). Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease*, 96(2), 186-192.

## Referencias bibliográficas

- Nicholson, P., Simpson, D. R., Wilson, A. H., Chandler, E., y Thomsett, M. (2004). Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* (pp. 503-514). Springer Netherlands.
- Nicolaisen, M., Supronienè, S., Nielsen, L. K., Lazzaro, I., Spliid, N. H., y Justesen, A. F. (2009). Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 234-240.
- Niessen, M. L. y Vogel, R. F. (1998). Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(4), 618-631.
- Nieto, L. (1993). El Complejo Pudrición del cogollo de la Palma de Aceite. *Revista Palmas*, 14(1), 14-16.
- Nieto, L. (1996). Identificación y reproducción del complejo pudrición de cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Revista Palmas*, 17(2), 63-67.
- Nieto, L. E. y Gómez, P. L. (1991). Estado actual de la investigación sobre el complejo pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Revista Palmas*, 12 (2), 57-67.
- Nieto, L., Gómez, O., y Tovar, C. (1996). Identificación y reproducción del complejo pudrición de cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Revista Palmas*, 17(2), 63-67.
- Nieto, P. (1996). Síntomas e identificación del agente causal del complejo pudrición del cogollo de palma de aceite, *Elaeis guineensis* Jacq. *Revista Palmas*, 71(2), 57-60.
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., y Sarver, B. A. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46(12), 936-948.

## Referencias bibliográficas

- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., y Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61-78.
- Ochoa, G. y Bustamante E. (1974). Investigación del agente causal de la pudrición de la flecha en palma africana. *Revista ICA (Colombia)*, 9(4), 4255-4333.
- Octavia, S. y Lan, R. (2014). The Family Enterobacteriaceae. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. pp. 225-286.
- O'Donnell, K. (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92, 919-938.
- Oliveira, M. J. D., Laranjeira, D., Câmara, M. P. S., Laranjeira, F. F., Armengol, J., y Michereff, S. J. (2014). Effects of wounding, humidity, temperature, and inoculum concentrations on the severity of corky dry rot caused by *Fusarium semitectum* in melon fruits. *Acta Scientiarum Agronomy*, 36(3), 281-289.
- Perthuis, B. (1990). Investigation about the bud rot disease (PC) of Oil Palm the Amazonian part of Ecuador: search of the insect vector. In: spear rot oil palm in Tropical America. In Proceedings of the first International Seminar on the Identification and Control of the organism (s) and/or others factor(s) causing the spear rot syndrome in oil palm. Paramaribo. Surinam, 8-12 March 1998, 51-56.
- Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage, Chapter 12 Spoilage of Stored, Processed and Preserved Foods. Springer Science Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, USA, pp. 401-421.
- Ploetz, R. C. (2006). *Fusarium* Induced Diseases of Tropical Perennial Crops. *Phytopathology*, 96(6), 648-652.
- Quesada-Ocampo, L. M., Butler, S., Withers, S., y Ivors, K. (2014). First Report of *Fusarium* Rot of Garlic Bulbs Caused by *Fusarium proliferatum* in North Carolina. *Plant Disease*, 98(7), 1009-1009.

## Referencias bibliográficas

- Rahman, M. M., Ali, M. E., Khan, A. A., Hashim, U., Akanda, A. M., y Hakim, M. A. (2012). Characterization and identification of soft rot bacterial pathogens in Bangladeshi Potatoes. *African Journal of Microbiology Research*, 6(7), 1437-1445.
- Rashid, U., Khan, M. R., Jan, S., Bokhari, J., y Shah, N. A. (2013). Assessment of phytochemicals, antimicrobial and cytotoxic activities of extract and fractions from *Fagonia olivieri* (Zygophyllaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 167.
- Renard, J. L. (1991). Pudrición de Cogollo en el Ecuador. Aspectos Generales. Fitopatología en Palmeras del Ecuador, Shushufindi (Ecuador). *Revista Palmas*, 12(2), 31-32.
- Renard, J. L. y Quillec, G. (1984). Les maladies graves du palmier á huile en Afrique et den Amérique du Sud. *Oléagineux*, 39(2), 57-67.
- Richardson, D. L. (1995). The history of oil palm breeding in the United Fruit Company. *ASD Oil Palm Papers*, 11, 1-22.
- Rochat, D., Mohammadpoor, K., Malosse, C., Avand-Faghieh, A., Lettere, M., Beauhaire, J., y Abdollahi, G. A. (2004). Male aggregation pheromone of date palm fruit stalk borer *Oryctes elegans*. *Journal of Chemical Ecology*, 30(2), 387-407.
- Ronquillo, Mayra. (2012). Etiología de la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en el Ecuador. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayaguez, 101 p.
- Ronquillo-Narváez, M., Estévez de Jensen, C., y Bernal, G. (2013). *Fusarium* spp., associated with bud rot of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Ecuador. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 97(3-4), 135-148.
- Rozas, J., Sánchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X., y Rozas, R. (2007). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496-2497.

## *Referencias bibliográficas*

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Santos Rubio, A. E. (2010). Análisis de las últimas investigaciones sobre pudrición del cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Tesis Especialista. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Especialización en Cultivos Industriales. Bogotá. Colombia, 39 p.
- Saseetharan, N. H. M. y Zakaria, L. (2014). Tropical Agricultural Science. *Journal of Tropical Agricultural Science*, 37(4), 445-454.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., y Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition. *The American Phytopathology Society*, St. Paul, MN.USA.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., y Chen, W. (2012). Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci.USA*. 109(16), 6241-6246.
- Shekari, A., Mirabolfathi, M., Mohammadi-Pour, M., Zad, J., y Okhovvat, M. (2006). *Phytophthora* rot and crown rot of several field and vegetable crops in east Azarbaijan province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 42(2), 293-308.
- Shephard, G. S., Sewram V., Nieuwoudt, T. W., Marasas, W. F. O., y Ritieni, A. (1999). Production of the mycotoxins fusaproliferin and beauvericin by South African isolates in the *Fusarium* section *Liseola*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(12), 5111-5115.
- Skovgaard, M., Jensen, L. J., Brunak, S., Ussery, D., y Krogh, A. (2001). On the total number of genes and their length distribution in complete microbial genomes. *Trends in Genetics*, 17(8), 425-428.

## *Referencias bibliográficas*

- Sugiura, Y., Barr, J. R., Barr, D. B., Brock, J. W., Elie, C. M., Ueno, Y., Patterson, D. G. Jr., Potter, M. E., y Reiss, E. (1999). Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. *Mycological Research*, 103(11), 1462-1468.
- Suwandi Akino, S. y Kondo, N. (2012). Common spear rot of oil palm in Indonesia. *Plant Diseases*. 96(4), 537-543.
- Suzuki, T., Kurisu, M., y Ichinoe, M. (1981). Trichothecenes producing fungi of *Fusarium* species. *Maikotokishin Proc. Japan. Assoc. Mycotoxicology*, 13, 34-36.
- Swinburne, T. R. (1993). Fatal yellows bud rot and spear rot on African oil palm. A comparison of the symptoms of these diseases in Brasil, Ecuador y Columbia. *Planter*, 69(802), 15-23.
- Tan, M. K. y Niessen, L. M. (2003). Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Mycological Research*, 107(07), 811-821.
- Toussoun, T. A., Nelson, P. E. y Marasas, W. F. (1983). *A Pictorial Guide to the Identification of Fusarium species*. Second Ed. The Pennsylvania State University Press.
- Townsend, G. R. y Heuberger, J. W. (1943). Methods for stimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report*, 27(17), 340-343.
- Turner, P. (1988). *Oil palm diseases and disorders*. Oxford University Press, Kuala Lumpur. 280 p.
- Van de Lande, H. (1983). Studies on the epidemiology of spear rot in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Suriname. Wageningen (NLD): Landbouwniversiteit. 153 p.
- Van de Lande, H. L. y Zadoks J. C. (1999). Spatial patterns of spear rot in oil palm plantations in Suriam. *Plant pathology*, 48(2), 189-201.

## Referencias bibliográficas

- Varghese, G. (1965). Parasitic diseases of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) with particular reference to pathological problems of this crop in Malaya. *Malaysian Agriculturalist Journal*, 6, 3-14.
- Végh, A. y Palkovics, L. (2013). First appearance of *Dickeya chrysanthemi* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) on *Chrysanthemum* in Hungary. *Növényvédelem*, 49(11), 486-490.
- Vesonder, R. F. y Hesseltine, C. W. (1983). Metabolites of *Fusarium*. En, P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook. (Eds). *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy. Part IV. The Fungus Fusarium: Physiology and Histopathology*. (pp 351-364). Pennsylvania State University Press. USA.
- Viswanathan, R., Poongothai, M., Malathi, P., y Ramesh Sundar, A. (2012). Sugarcane wilt: New insights into the pathogen identity, variability and pathogenicity. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 6, 30-39.
- Welsh, J. y Mc Clelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24), 7213-7218.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds) (pp.315-322). Academic Press, New York, USA.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Hietaniemi, V., Jestoi, M., y Rizzo, A. (2004). Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae* as compared to mycotoxin production in grains in Finland. In *2nd International Symposium on Fusarium Head Blight*. p. 422.
- Zaccardelli, M., Balmas, V., Altomare, C., Corazza, L., y Scotti, C. (2006). Characterization of Italian isolates of *Fusarium semitectum* from alfalfa (*Medicago sativa* L.) by AFLP analysis, morphology, pathogenicity and toxin production. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 454-460.

## *Referencias bibliográficas*

Zambrano, J. (1991). Evolución y manejo del complejo pudrición de cogollo en palma aceitera de la Hacienda La Cabaña. Municipio de Cumaral (Meta), Colombia. Memorias Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. 12. Manizales. mayo 26-30 de 1991. Memorias ASCOLFI. Manizales, 21 p.

Zambrano, J., Santacruz, L., y Amézquita, M. (2004). Comportamiento de la Pudrición de Cogollo en la zona oriental de Colombia. *Revista Palmas*, 25(No. Especial, Tomo II), 221-231.

Zeng, L. S., Zhao, Z. H., Lu, S., Xi, Z. J., Li, M. H., y Xi, P. G. (2013). The *Fusarium* species isolated from banana and their phylogenetic relationships. *Mycosystema*, 32, 617-632.

Zhang, J., Shen, H., Pu, X., Lin, B., y Hu, J. (2014). Identification of *Dickeya zea* as a Causal Agent of Bacterial Soft Rot in Banana in China. *Plant Disease* 98(4), 436-442.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Datos climatológicos registrados en la estación meteorológica “La Chiquita” de la empresa Palmeras de Los Andes, en el año 2014 en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador.

## AÑO 2014

MES	T. Extrema (°C)		Term. seco			Term. húmedo			Evapor. potencial				Precipitaciones (mm)				Heliofanía		
	Max	Min.	7	13	19	7	13	19	7	13	19	Total	13	19	7	Total	7 a 19	13 a 19	Total
	Enero	33,40	19,80	23,31	27,92	25,65	23,15	25,46	24,56	17,80	7,90	16,60	42,30	268,60	73,50	44,20	386,30	29,30	26,00
Febrero	37,40	12,20	23,09	28,64	26,54	23,09	25,62	25,00	16,90	13,10	17,20	47,20	129,90	13,60	29,90	173,40	42,80	41,90	84,70
Marzo	36,40	20,00	23,61	29,73	26,94	23,48	26,13	24,97	18,20	13,30	23,40	54,90	345,60	35,70	28,30	409,60	58,60	45,30	103,90
Abril	34,20	20,40	24,03	29,74	26,85	23,75	26,29	25,42	14,80	15,10	20,30	50,20	464,90	39,90	29,50	534,30	67,80	45,60	113,40
Mayo	33,40	18,80	23,18	28,10	26,23	23,17	25,79	24,86	15,40	13,30	12,50	41,20	365,10	35,20	11,10	411,40	24,50	17,60	42,10
Junio	35,40	21,20	23,25	28,35	26,19	23,15	26,04	24,83	19,60	14,90	25,70	60,20	180,00	1,30	19,80	201,10	30,50	22,60	53,10
Julio	35,60	21,80	22,78	28,17	25,64	22,71	25,41	24,26	13,30	22,60	23,50	59,40	89,30	11,70	9,30	110,30	38,10	28,30	66,40
Agosto	35,00	20,00	22,66	27,99	25,95	22,61	25,53	24,44	15,40	23,00	15,60	54,00	103,30	14,30	1,40	119,00	39,40	26,00	65,40
Septiembre	35,20	20,00	23,07	28,23	25,63	22,97	26,09	24,84	11,40	13,00	13,60	38,00	141,80	10,20	5,10	157,10	39,90	16,50	56,40
Octubre	32,80	20,80	23,09	27,78	25,68	22,91	25,80	24,44	9,80	15,50	13,50	38,80	143,80	29,20	39,60	212,60	36,80	18,00	54,80
Noviembre	35,60	20,40	22,98	29,03	26,04	23,03	27,03	25,01	9,70	19,40	19,60	48,70	11,20	1,00	0,50	12,70	73,50	26,90	100,40
Diciembre	33,40	20,00	22,99	28,64	26,08	22,91	25,52	24,76	17,70	18,10	16,70	52,50	99,20	8,60	0,00	107,80	36,00	7,70	43,70
TOTAL	417,80	235,40	278,03	342,33	313,42	276,94	310,71	297,38	180,00	189,20	218,20	587,40	2342,70	274,20	218,70	2835,60	517,20	322,40	839,60
PROMEDIO	34,82	19,62	23,17	28,53	26,12	23,08	25,89	24,78	15,00	15,77	18,18	48,95	195,23	22,85	18,23	236,30	43,10	26,87	69,97
													82,62%	9,67%	7,71%	100,00%			

(continuación Anexo 1.)

Datos climatológicos registrados en la estación metereológica “La Chiquita” de la empresa Palmeras de Los Andes, desde enero a julio del año 2015 en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador.

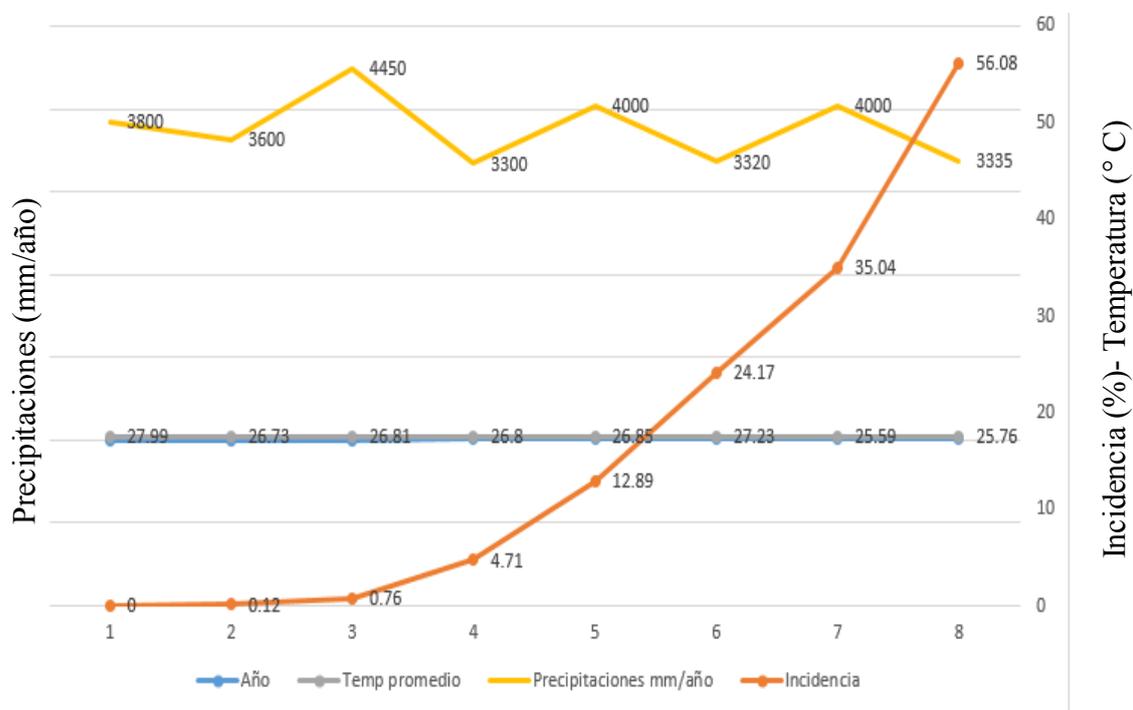
AÑO 2015

MES	T. Extrema (°C)		Term. seco			Term. húmedo			Evapor. potencial				Precipitaciones (mm)				Heliofanía		
	Max.	Min.	7	13	19	7	13	19	7	13	19	Total	13	19	7	Total	7 a 19	13 a 19	Total
	Enero	33,4	21,0	23,1	28,9	26,3	23,1	26,3	25,0	6,5	20,3	24,4	51,2	331,0	10,4	17,8	359,20	42,9	25,1
Febrero	33,6	20,4	23,0	28,6	26,1	23,0	25,9	24,9	6,9	13,1	16,5	36,5	227,4	56,9	56,0	340,3	39,5	20,3	59,8
Marzo	36,6	19,8	23,1	29,4	26,5	23,2	26,7	25,2	7,7	21,0	22,2	50,9	400,9	71,0	4,1	476,0	70,2	40,8	110,9
Abril	33,6	20,0	23,8	29,7	26,6	23,8	26,7	25,6	5,0	15,2	20,5	40,7	381,9	32,3	19,8	434,0	47,4	40,7	88,1
Mayo	33,6	22,0	23,5	29,8	26,4	23,5	26,8	25,5	6,2	18,4	21,8	46,4	536,1	17,8	32,4	586,3	48,4	50,4	98,8
Junio	35,2	21,8	23,9	29,4	26,7	23,9	26,3	25,4	5,9	19,1	17,4	42,4	198,2	20,60	20,1	238,9	50,5	46,1	96,6
Julio	36,4	22,0	23,6	29,7	26,7	23,6	26,4	25,4	5,6	23,9	20,6	50,1	84,8	0,1	40,6	125,5	58,5	70,5	129,0
Total	242,4	147,0	164,0	205,5	185,3	164,1	185,1	177,0	43,8	131,0	143,4	318,2	2159,9	209,1	150,2	2560,2	357,4	293,9	651,2
Promedio	34,62	21,0	23,42	29,35	26,47	23,44	26,44	25,28	6,25	18,71	20,48	45,45	308,58	29,89	21,46	365,74	51,05	41,98	93,02
													84,58%	8,20%	5,90%	98,61%			

**Anexo 1.** Datos de temperatura (°C) y precipitaciones (mm) registrados en la Estación de la Empresa Energy & palma desde el año 2014 a julio 2015 en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador.

Meses	Temperatura mensual promedio °C		Precipitación mm/mes	
	AÑO		AÑO	
	2014	2015	2014	2015
Enero	25,61	25,25	244,48	316,66
Febrero	25,37	25,81	286,61	268,65
Marzo	25,90	26,00	382,41	78,85
Abril	26,19	26,65	248,27	325,3
Mayo	26,02	25,84	440,76	653,2
Junio	26,02	26,45	366,32	416,44
Julio	26,09	26,07	116,01	398,67
Agosto	25,61		221,9	
Septiembre	25,48		65,1	
Octubre	25,84		209,73	
Noviembre	25,92		105,6	
Diciembre	25,71		153,16	
Total			2840,4	2457,80
Promedio Mensual	25,82	26,01	236,67	351,14
Primer semestre			1968,9	2059,13
Segundo semestre			871,5	398,67

**Anexo 2.** Relación entre los registros de precipitaciones y temperatura media y la incidencia de la pudrición del cogollo en San Lorenzo, provincia de Esmeraldas, Ecuador.



Nota 1= 2006, 2=2007, 3=2008, 4=2009, 5=2010, 6=2011, 7=2012, 8=2013

Relación entre los registros de precipitaciones y temperatura media promedio del año 2013 y la intensidad de ataque promedio de la pudrición del cogollo en San Lorenzo (provincia de Esmeraldas, Ecuador)

Precipitación media anual (mm)	Temperatura media anual (° C)	Intensidad de ataque promedio
3335	25.76	46.25