

ARTÍCULO ORIGINAL

Organismos asociados a la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) en San Lorenzo, Ecuador

Fernando Rivas Figueroa^{I*}, Lidcay Herrera Isla^{II}

^IFacultad de Recursos Naturales, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Código postal 060150, Ecuador.

^{II}Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas, Santa Clara,
Código postal 50400. Cuba.

RESUMEN: El presente trabajo se realizó con el objetivo de aislar los microorganismos asociados a la enfermedad Pudrición del Cogollo de la palma aceitera. Para ello, se seleccionaron plantas con manifestaciones de los síntomas característicos de la enfermedad y se tomaron fragmentos de los tejidos afectados. Las muestras se lavaron en agua corriente durante 15 minutos, luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) por 5 minutos y, finalmente, se lavaron con agua destilada estéril. Las secciones de tejidos se secaron en papel filtro estéril en cámara de flujo laminar y se colocaron en medio Agar Agua estéril al 2% y se incubaron a 25°C ± 1. Las estructuras observadas se sembraron en medios estériles PDA 3,8% y Agar Nutriente 2,8% para aislar los hongos y las bacterias, respectivamente. Los resultados mostraron a *Fusarium* como el género asociado más prevalente, principalmente las especies *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen, *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg y *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen. Además, se aislaron *Chalaropsis* sp., *Diplodia* sp. y aislados bacterianos pertenecientes al género *Erwinia*.

Palabras clave: *Chalaropsis*, *Diplodia*, *Erwinia*, *Fusarium*, pudrición del cogollo.

Organisms associated with the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) bud rot in San Lorenzo, Ecuador

ABSTRACT: The present work was aimed to isolate microorganisms associated with the bud rot disease in oil palm. Samples of infected tissues were taken from plants with typical symptoms of the disease. They were washed with tap water for 15 minutes, disinfected with a 2% sodium hypochlorite solution for 5 minutes, and finally washed with sterile distilled water. Tissue fragments were blot-dried on sterile filter paper in a laminar flow cabinet, placed on sterile 2% water agar, and incubated at 25°C ± 1 for 2 to 7 days. The structures observed were transferred to sterile PDA (3.8%) and Nutrient Agar (2.8%) to isolate fungi and bacteria, respectively. *Fusarium* was the prevalent fungal genus, and the main species identified were *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen, *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, and *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen. Besides, *Chalaropsis* sp., *Diplodia* sp., and bacterial isolates belonging to the genus *Erwinia* were also identified.

Key words: *Chalaropsis*, *Diplodia*, *Erwinia*, *Fusarium*, bud rot.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el cultivo de la palma aceitera tiene gran importancia económica en la producción agrícola; la superficie sembrada de esta especie es de 280 000 hectáreas (1). Dentro de las enfermedades que afec-

tan la producción se encuentra una grave enfermedad conocida como pudrición del cogollo, PC o complejo PC, que ha provocado daños de relevante consideración económica al destruir plantaciones enteras en varios países de América Latina, tales como Panamá, Colombia, Surinam, Ecuador y Brasil (2, 3).

* Autor para correspondencia: Fernando Rivas Figueroa.
Correo electrónico: frivas@espoch.edu.ec.

En la Provincia Esmeraldas, en la zona de San Lorenzo, la enfermedad PC ha provocado, en los últimos seis años, pérdidas de más de 4000 hectáreas; lo cual representa una seria amenaza para la producción palmera en San Lorenzo, Eloy Alfaro, la Concordia y Quinindé (4).

La sintomatología de la enfermedad se presenta como clorosis y amarillamiento en las hojas jóvenes, necrosis de los folíolos de la base hacia la parte distal, pudrición descendente del paquete de flechas, colapso y doblamiento de las hojas jóvenes. La pudrición del cogollo puede mostrar un color anaranjado-amarillento o café-rojizo, que se extiende hacia abajo hasta alcanzar el punto de crecimiento y causar la muerte de la palma (5, 6).

La primera investigación detallada y publicada sobre la PC se realizó en las plantaciones de Lever Brothers en el sur este de la República Democrática del Congo (Zaire). Después de trabajos de campo y laboratorio se identificó a la bacteria *Erwinia lathyr* como el organismo causal, a pesar que puede ser aislada también de plantas sin síntomas (7).

Años más tarde, investigadores colombianos informaron la presencia de varias especies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium solani* (8) y un complejo fúngico que comprende *Fusarium* sp., *Pythium* sp. y *Thielaviopsis paradoxa* como los agentes asociados a la enfermedad PC (9), en el cual se resalta el papel de *T. paradoxa* en la patogénesis (10).

En otros estudios 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 hay evidencias claras de que alguno, o algunos de ellos, sean los responsables de la enfermedad, ya que no ha sido posible reproducirla (11).

Sobre la base de la problemática anterior, el presente estudio tuvo como objetivo aislar e identificar los organismos asociados a la pudrición del cogollo en las plantaciones palmeras de la zona de San Lorenzo, provincia Esmeralda, Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras de plantas enfermas

En los meses de octubre y diciembre de 2012 se recolectaron muestras de tejidos afectados por la pudrición de cogollo en plantaciones de cinco empresas palmicultoras y plantas de vivero enfermas del hí-

brido Coarí x La Mé y *Elaeis guineensis*, de las Empresas Palmeras de Los Andes y Alespalma (Fig.1).

Las palmas enfermas se cortaron transversalmente en la base del tallo, mediante el empleo de una motosierra. Posteriormente, se retiraron todas las hojas del estipe dejando el paquete central de flechas. Luego, se realizó un nuevo corte transversal en el estipe a la altura del último racimo de fruta y, por último, se practicó un corte longitudinal a nivel del cogollo de la planta. Se colectó material de tejido sano y enfermo de la zona de cogollo, la flecha y las raíces. Se colocó el material en papel kraft con su debida identificación y se transportó en nevera portátil al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

Aislamiento de organismos asociados a la PC

El aislamiento de microorganismos de tejido enfermo, de un primer muestreo, se realizó en el Laboratorio de la Empresa Alespalma y en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la ESPOCH; se efectuó el aislamiento de los organismos asociados de las plantas enfermas de vivero del material híbrido Coarí x La Mé y *Elaeis guineensis*, así como de tejidos enfermos de un segundo muestreo en las plantaciones comerciales de las empresas palmicultoras seleccionadas.

A nivel de laboratorio se practicaron cortes en las muestras de tejidos enfermos en pequeñas secciones, las cuales se lavaron en agua corriente por 15 minutos; luego, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos; 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 practicaron pequeños cortes de 5 a 8 mm en las secciones de tejidos enfermos. Los cortes se sembraron inicialmente en medio de cultivo estéril agar-agua al 2% para promover el desarrollo microbiano y se incubaron las placas Petri a 25°C ± 1 durante 2 a 7 días. Las floras microbiana fúngica y bacteriana presentes se transfirieron a los medios estériles PDA al 3,8% y Agar Nutritivo al 2,8%, respectivamente, y se incubaron a 25° C±1 durante 7 días. Posteriormente, se hicieron reaislamientos de los agentes microbianos fúngicos y bacterianos para obtener cultivos puros (12). Los cultivos puros se registraron y se almacenaron en placas Petri debidamente selladas en gabinetes a temperatura ambiente.

Identificación morfológica-cultural de los aislamientos fúngicos

Para la identificación de los aislados fúngicos se tomaron en consideración las características cultura-

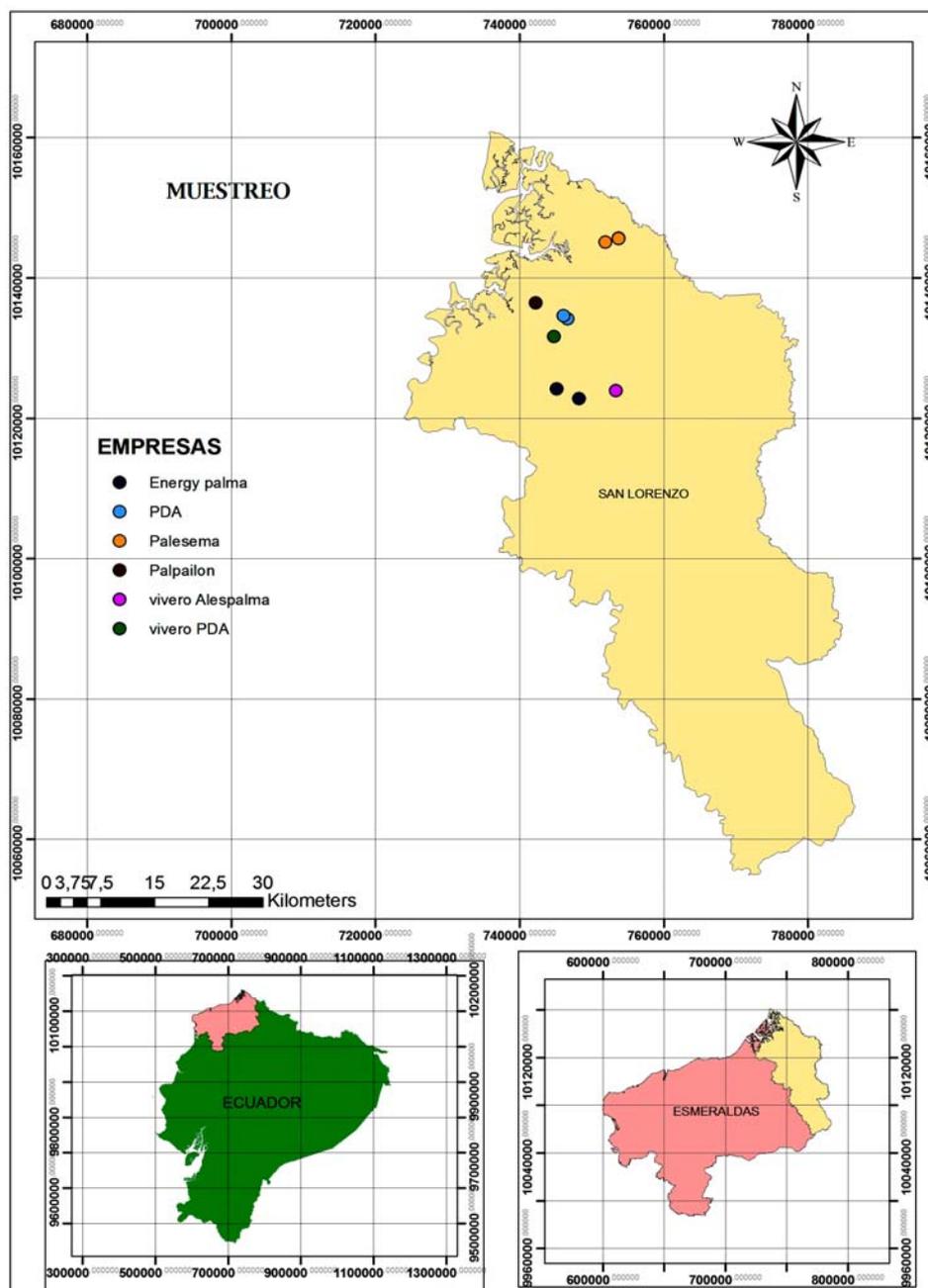


FIGURA 1. Ubicación geográfica de las plantaciones de palma aceitera en el Cantón San Lorenzo de la Provincia Esmeraldas./ *Location of oil palm plantations in the Canton San Lorenzo of Esmeraldas province.*

les en medio Papa Dextrosa Agar (coloración del medio de cultivo) y las características de las estructuras reproductivas, utilizando claves taxonómicas morfológicas establecidas para el efecto (13, 14).

Identificación molecular de los agentes fúngicos asociados a la enfermedad

Para los análisis moleculares se tomaron en consideración los géneros fúngicos que aparecieron con

mayor frecuencia en las muestras analizadas del híbrido Coarí x La Mé. El ADN de cada aislamiento se obtuvo a partir de cultivos monospóricos. Para ello, se tomó un disco de micelio de 0.5 cm de diámetro de los aislados, provenientes de Placas Petri con 10 ml de medio PDA, donde los aislados crecieron durante 15 días. Los discos se colocaron en Erlenmeyers (250 ml de capacidad) que contenían 100 ml del medio de cultivo líquido B5 (15, 16), suplementado con sacarosa

2% (17). Los mismos se colocaron en agitación (agitador orbital GFL) a 120 rpm y temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$ durante tres semanas. Transcurrido este periodo, se colectó el micelio por filtración con un filtro millipore ($45\mu\text{m}$) y se conservó en congelación (-20°C) hasta su utilización. La extracción del ADN genómico total se realizó usando el kit de extracción Trizol DNA (Sigma-Aldrich Co., Mo, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y se conservó el ADN extraído en $50\ \mu\text{l}$ del tampón TE. Las concentraciones de ADN se calcularon por la medición de la absorbancia en la longitud de onda de $260\ \text{nm}$ en un espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer Pharmacia, LKB), según lo referido (18).

Se amplificó la región ITS del ADN utilizando los primers ITS1-F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') y ITS4 (5'-TCCTCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), acorde con lo sugerido por White *et al.* (19). La mezcla de reacción de PCR empleada tuvo un volumen final de $25\ \mu\text{L}$, estuvo compuesta por Tampón PCR 10 X (tris-HCl 10mM, KCl 50mM., MgCl_2 1,5mM), dNTPs 200uM, 100ng de ADN, cebadores ITS4f e ITS4r $10\ \mu\text{M}$ de cada uno y 1U de Taq polimerasa (Promega, Madison, WI, USA).

Las amplificaciones se ejecutaron en un termociclador (PTC-100; MJ Research, Inc) que desarrolló el siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial a 94°C (30 segundos), hibridación a 55°C (30 segundos) y extensión a 72°C (1 minuto); estos pasos se repitieron en 35 ciclos sucesivos y se efectuó un paso de extensión final a 72°C por 7 minutos (20).

Los productos del PCR se purificaron al usar el Kit QIAquick® kit (QIAGEN, Germany), para ello se siguieron las instrucciones del fabricante y se secuenciaron en ambas direcciones en un Secuenciador de DNA, ABI prisma automatizado (modelo 377, versión 2.1.1; Applied Biosystems Warrington, United Kingdom) con cebadores ITS4f e ITS4r.

Para el análisis de las secuencias de las ITS obtenidas se realizó la comparación con secuencias archivadas en GenBank usando análisis tipo BLAST.

Identificación morfológica y bioquímica de bacterias

La identificación de los aislamientos bacterianos seleccionados se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas en Cuba, para lo cual se siguieron los procedimientos morfológicos y bioquímicos descritos (21). Los aisla-

dos bacterianos se caracterizaron bioquímicamente sobre la de los siguientes aspectos: crecimiento a 36°C , producción de ácido a partir de lactosa, producción de indol, prueba oxidativa-fermentativa (O/F), producción de pigmentos fluorescentes en medio King B, hidrólisis de gelatina y pudrición de rodajas de papa, según lo referido por Lelliott y Stead (21). Las colonias bacterianas inoculadas en los distintos medios se incubaron a 28°C por 72 horas. Además, se probó la reducción de la sacarosa con el reactivo de Benedict; para esto, en los tubos de ensayo que contenían medio de cultivo con las diferentes cepas bacterianas puras, se les adicionaron 5 ml del reactivo a cada uno de los tubos y se comparó con un control experimental. Luego de colocar los tubos en vaso de precipitación con agua caliente en baño María por 10 minutos, se observó y se registró la reacción de cada cepa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Organismos aislados asociados al complejo PC

Los microorganismos aislados asociados al complejo PC ascendieron a 63 aislamientos fúngicos, de los cuales el 85,71 % correspondió al género *Fusarium* spp.; 6,34% al género *Trichoderma* sp.; 1,58% al género *Diplodia* sp.; 3,17% al género *Chalaropsis* sp; 1,58% al género *Colletotrichum* sp. y 1,58% al género *Pestalotiopsis* sp. (Tabla 1). Además, se obtuvieron 27 aislamientos bacterianos.

A partir del resultado anterior se seleccionaron 12 aislamientos correspondientes al género *Fusarium* spp., para la identificación de especie (Tabla 2).

Identificación morfológica cultural de aislamientos fúngicos de *Fusarium* spp.

Las características morfológicas culturales de los 12 aislamientos del género *Fusarium* spp., se muestran en la Tabla 3. De ellos, 33,33% correspondió a *Fusarium proliferatum*, el 50 % a *Fusarium oxysporum* y 16,67 % a *Fusarium solani* (Tabla 4; Fig. 2, 3 y 4).

Identificación molecular de 2 aislamientos del género *Fusarium* asociados al complejo PC

Las secuencias obtenidas a partir de la amplificación de las regiones ITS permitieron confirmar los 2 agentes del género *Fusarium* asociados a la enfermedad. Para el caso del aislamiento PASL0712 se identificó como *F. proliferatum*, con el número de acceso al Gen Bank KJ 025005.1, mostró un porcentaje de homología del 99% y, para el caso del aislamiento PASL 0112, se determinó como *F. oxysporum*, con el número de acceso del Gen Bank KF 562122.1 mostró un porcentaje de homología de 99%.

TABLA 1. Aislamientos fúngicos obtenidos de tejidos de plantas enfermas con síntomas de PC en plantaciones comerciales en San Lorenzo./ *Fungal isolates from diseased plant tissues with bud rot symptoms in San Lorenzo commercial plantations*

Plantación empresa	Material	Sección afectada	No aislados	Organismo aislado
Alespalma*	<i>E. guineensis</i>	cogollo	2	<i>Fusarium</i> sp.
			1	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
Palesema 1	<i>E. guineensis</i>	raíces	2	<i>Fusarium</i> sp.
Palesema 2	<i>E. guineensis</i>	raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
		cogollo	1	<i>Fusarium</i> sp.
			1	<i>Trichoderma</i> sp.
Palesema 3	Coarí x LaMé	raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
Energy palma 1	<i>E. guineensis</i>	raíces	2	<i>Fusarium</i> sp.
		cogollo	3	<i>Fusarium</i> sp.
			1	<i>Diplodia</i> sp.
			1	<i>Colletotrichum</i> sp.
			1	<i>Chalaropsis</i> sp.
Energy palma 2	<i>E. guineensis</i>	raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
		cogollo	2	<i>Fusarium</i> sp.
			1	<i>Trichoderma</i> sp.
PDA 1	<i>E. guineensis</i>	raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
			1	<i>Trichoderma</i> sp.
		cogollo	1	<i>Fusarium</i> sp.
PDA 2	<i>E. guineensis</i>	raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
		cogollo	1	<i>Fusarium</i> sp.
			1	<i>Trichoderma</i> sp.
PDA 3	<i>E. guineensis</i>	raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
Alespalma vivero	<i>E. guineensis</i>	flecha	9	<i>Fusarium</i> sp.
		base meristemo	1	<i>Fusarium</i> sp.
			1	<i>Fusarium</i> sp.
			2	<i>Fusarium</i> sp.
PDA-Vivero	Coarí x LaMé	flechas	13	<i>Fusarium</i> sp.
		base meristemo	1	<i>Chalaropsis</i> sp.
		base raíces	3	<i>Fusarium</i> sp.
		raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
Palpailon 1	<i>E. guineensis</i>	raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
		cogollo	1	<i>Fusarium</i> sp.
Palpailon 2	<i>E. guineensis</i>	raíces	1	<i>Fusarium</i> sp.
		cogollo	1	<i>Fusarium</i> sp.

* Aislados remitidos por el Laboratorio de la Empresa Alespalma

Identificación morfológica y bioquímica de bacterias

De un total de 27 aislamientos bacterianos, obtenidos a partir de muestras de plantas en vivero y campo, atacadas por el complejo PC en las diversas empresas palmicultoras, se seleccionaron 7 aislamientos, teniendo en cuenta la reacción de Gram; sus características culturales se muestran en la Tabla 5.

Las pruebas morfofisiológicas demostraron la presencia de bacterias Gram negativas y de morfología bacilar típica del género *Erwinia* sp. (Fig. 5, Tabla 6).

Del género *Fusarium* prevalecieron las especies *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. solani*, mientras que fue menor la presencia *Chalaropsis* sp. y *Diplodia* sp., así como las cepas bacterianas del género *Erwinia*. Estos resultados coinciden con los referidos en otras investigaciones efectuadas en Colombia, el Congo y Ecuador (11, 6).

La presencia de la especie *F. proliferatum*, dentro del complejo de la PC de los agentes asociados en la zona de San Lorenzo, constituye el primer informe para San Lorenzo, Provincia Esmeraldas. Además, no se detectó la presencia de *Phytophthora* spp. asociadas

TABLA 2. Aislamientos seleccionados de *Fusarium* para su identificación morfológica-cultural a nivel de género./ *Fusarium isolates selected to be morphologically and culturally identified at the genus level*

Material	Sección planta	Código
<i>Elaeis guineensis</i>	flecha 3	Pasl 19
	flecha 5	Pasl 8
Coari x La Mé	flecha 2	Pasl 23
		Pasl 0212
	flecha 4	Pasl 18
		Pasl 0112
		Pasl 0812
Coari x La Mé	flecha 1	Pasl 31
		Pasl 0712
		Pasl 28
Coari x La Mé	Raíces	Pasl 63
<i>Elaeis guineensis</i>	Cogollo	Pasl 57

con esta enfermedad, lo cual concuerda con lo obtenido por otros autores (6). La presencia de aislados de *Erwinia* spp. sugiere que esta bacteria puede contribuir con las fases finales del proceso de pudrición del cogollo de la palma aceitera.

AGRADECIMIENTOS

Presentamos nuestros agradecimientos a las empresas Palmeras de Los Andes, Palesema, Energy & Palma, Alespalma y Paipailón establecidas en San Lorenzo y a la Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA) por su comprometida colaboración con la investigación de campo. Igualmente, agradecemos a la Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas en Cuba y a la Universidad de Sassari en Italia y a la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del agro, por apoyarnos en actividades de investigación a nivel de laboratorio en la identificación de los organismos asociados con la pudrición de cogollo en la palma aceitera.

TABLA 3. Características morfológicas culturales de los aislamientos del género *Fusarium*./ *Cultural and morphological characteristics of Fusarium isolates*

Códigos	Color medio cultivo en PDA	Clamidosporas	Conidióforos	Micro conidios	Macro conidios	Organismo identificado
Pasl 8 Pasl 31 Pasl 0712 Pasl 28	variable, violeta claro, violeta oscuro, blanquecina, rosada	ausentes	polifiálides y monofiálides	forman en cadena o en falsas cabezas, de forma ovoidal u ovoidal con la base trunca	delgados, con la pared ventral y dorsal casi paralela. 3 a 7 septas, general 3 a 5 septas.	<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg
Pasl 18 Pasl 19 Pasl 57 Pasl 0112 Pasl 0212 Pasl 0812	variable, blanquecina, violeta claro, violeta oscuro, rosado	presentes	monofiálides generalmente cortas y a manera de frasco	No septados, ovales, reniformes, producidos en falsas cabezas	tamaño variable de 3 a 7 septos	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl
Pasl 23 Pasl 63	variable, de blanco crema a gris con reflejos verdosos a azules	presentes, simples o en pareja	monofiálides, largas y no en forma de frasco	ovales y/o reniformes	de 3 a 7 septos, en general de 3 a 4 septos.	<i>Fusarium solani</i> (Martius) Sacc.

TABLA 4. Especies de *Fusarium* asociados al complejo PC./ *Fusarium species associated with the bud rot complex*

Código	Organismo asociado	Identificador*
PASL 8	<i>Fusarium proliferatum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 18	<i>Fusarium oxysporum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 19	<i>Fusarium oxysporum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 23	<i>Fusarium solani</i>	U. Sassari-Italia
PASL 28	<i>Fusarium proliferatum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 31	<i>Fusarium proliferatum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 57	<i>Fusarium oxysporum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 63	<i>Fusarium solani</i>	U. Sassari-Italia
PASL 0112	<i>Fusarium oxysporum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 0212	<i>Fusarium oxysporum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 0712	<i>Fusarium proliferatum</i>	U. Sassari-Italia
PASL 0812	<i>Fusarium oxysporum</i>	U. Sassari-Italia

* Virgilio Balmas, Instituto de Investigación Nacional. Unidad de Patología y Entomología) (comunicación personal) (22).

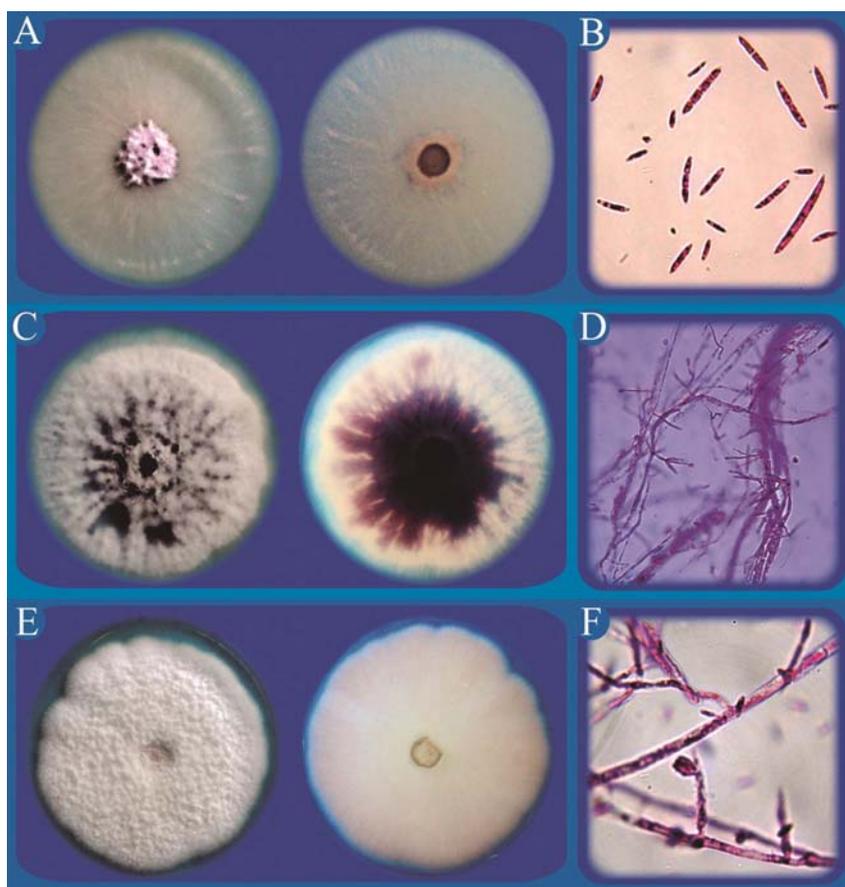


FIGURA 2. Aislamientos de *Fusarium proliferatum* en medio PDA: PASL8, colonia blanquecina (A), micro y macro conidios a 400x (B); PASL 31, colonia violeta (C) y conidióforos mono y polifiálides a 400x (D); PASL 0712, colonia blanquecina (E) y conidios presentes en falsas cabezas a 400x (F)./ *Fusarium proliferatum* isolates grown on PDA medium: PASL8, white colony (A), micro and macro conidia at 400x magnification (B); PASL 31, purple colony (C) and conidiophores mono- and polyphyalidic at 400x (D); PASL 0712, white colony (E), and conidia formed in false head at 400x magnification F).

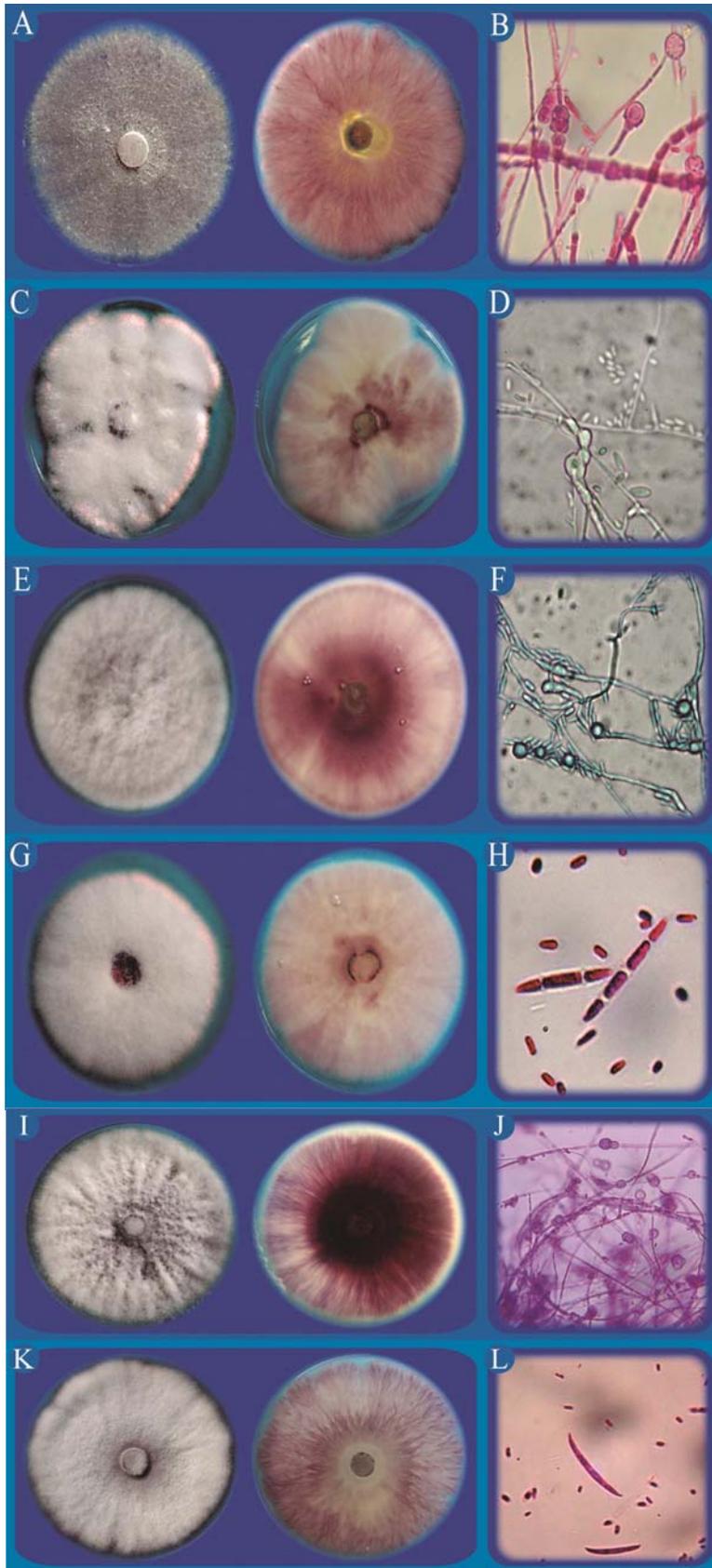


FIGURA 3. Aislamientos de *Fusarium oxysporum* en medio PDA: PASL18, colonia violeta clara (A), clamidosporas a 400x (B); PASL 19, colonia violeta clara (C), microconidios y clamidosporas a 400x (D); PASL 57, colonia violeta blancuecina (E), microconidios y clamidosporas a 400x (F); PASL0112, colonia violeta claro (G), microconidios y macroconidios con 3 septas a 400x (H). PASL 0212, colonia violeta oscura (I), clamidosporas a 400x (J); PASL 0812, colonia violeta (K), macro y microconidios a 400x (L)./ *Fusarium oxysporum* isolates grown on PDA medium: PASL18, light purple colony (A), chlamydoconidia at 400x magnification (B); PASL 19, light purple colony (C), microconidia and chlamydoconidia at 400x magnification (D); PASL 57, light purple to white colony (E), microconidia and chlamydoconidia at 400x magnification (F); PASL0112, light purple colony (G), microconidia and macroconidia with 3 septa at 400x magnification (H). PASL 0212, dark purple colony (I), chlamydoconidia at 400x magnification (J); PASL 0812, purple colony (K), macro and microconidia at 400x magnification (L).

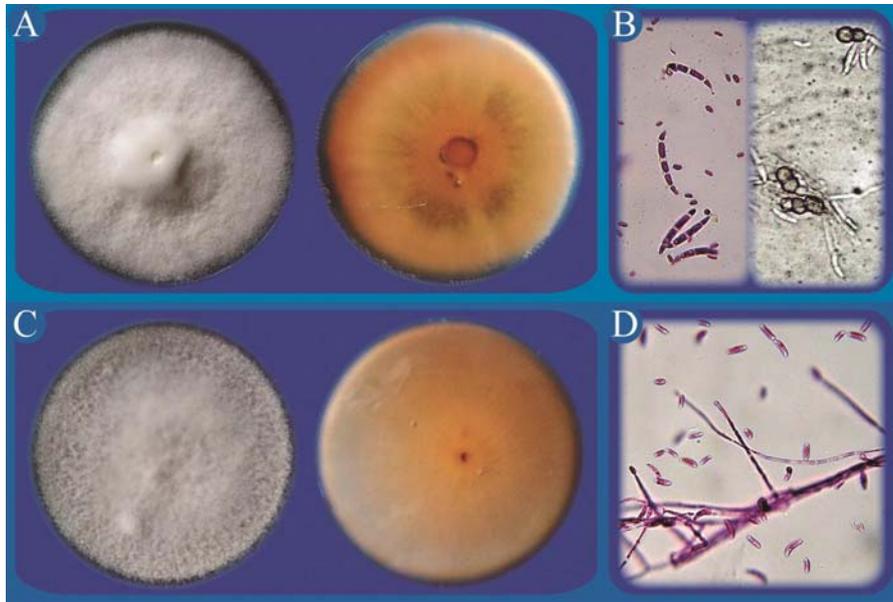


FIGURA 4. Aislamientos de *Fusarium solani* en medio PDA: PASL 23, colonia cremosa-amarillenta (A), macroconidios y clamidosporas a 400x(B); PASL 63, colonia blanca-cremosa (C) y microconidios y fiálides a 400x(D)./ *Fusarium solani* isolates grown on PDA: PASL PASL 23, cream yellow colony (A), macroconidia and chlamydospores at 400x magnification (B); PASL 63, white-cream colony (C) microconidia and phyalides at 400x (D).

TABLA 5. Características culturales de los aislamientos bacterianos./ *Cultural characteristics of the bacterial isolates*

Aislado	Sección planta	Color colonia	Código
EG vivero	base raíces	blanco cremosa	C 16
EG vivero	base raíces	blanca-crema	C 17
EP 2	Cogollo	blanco cremosa	C 35
PDA 2	Cogollo	blanca-crema	C 50
EP 1	Raíces	blanca-crema	C 53
Coarí 1 vivero	Flecha	blanca-crema	CE1
Coarí 2 vivero	Flecha	blanca-crema	CE2



FIGURA 5. Aislamiento de *Erwinia* sp., en medio Agar Nutriente: Colonias bacterianas blanco-cremosas (A) y bacilos solos o en pareja con Reacción Gram negativo a 1000x(B)./ *Isolation of Erwinia* sp. on nutrient agar medium. Creamy white colonies (A) and single or in pair gram-negative rods at 1000x magnification (B).

TABLA 6. Caracterización bioquímica de aislamientos bacterianos de plantas enfermas con Pudrición de Cogollo./ *Biochemical characterization of bacterial isolates from diseased plants with bud rot.*

Pruebas	Aislamientos bacterianos						
	C16	C17	C35	C50	C53	CE1	CE2
Forma	p	b	b	b	b	b	b
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento 36°C	+	+	+	+	+	+	+
Compuestos reductores a partir de sacarosa	+	-	+	-	-	-	-
Producción de ácido a partir de lactosa	+	-	+	-	v	+	+
Producción Indol	-	-	-	-	-	-	-
Oxidativo/fermentativo (OF)	F	F	F	F	F	F	F
Pigmentos fluorescentes (King B)	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina	+	-	+	-	+	+	+
Pudrición de rodajas de papa	+	+	+	+	+	+	+

b- bacilo; v- variable; + positiva; - negativa.

REFERENCIAS

1. ANCUPA. Ecuador País palmicultor. Revista Palma. Edición Especial. 2010;23:34-42.
2. De Franqueville H. Oil Palm Bud Rot in Latin America. Cambridge University Press. 2003;39:225-240.
3. Santos AE. Análisis de las últimas investigaciones sobre pudrición del cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq). trabajo de grado para optar al título de especialista en cultivos perennes industriales, Bogotá, Colombia. 2010;39p.
4. El cogollo mantiene en ajeteo a los palmicultores ecuatorianos. [consultado en agosto de 2011] <http://www.hoy.com.ec.2011>.
5. Laing D. Causa de la pudrición de cogollo en la palma de aceite papel del calcio en una hipótesis abiótica-edáfica. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Santo Domingo, Ecuador. 17 - 19 Noviembre 2010: 24.
6. Ronquillo M, Estévez de Jensen C, Bernal G. *Fusarium* spp. asociados a la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) en Ecuador. J Agric Univ P.R. 2013;97(3-4):135-148.
7. Duff ADS. The bud rot/Little leaf disease of the oil palm. Journal of Waifor. 1963;4(14):176-190.
8. Chinchilla C. Las pudriciones de cogollo en palma aceitera: La complejidad del desorden y una guía de convivencia ASD. Costa Rica (citado 2012, ago 18). Disponible en: <http://www.asd-cr.com/paginas/español/articulos/Guia-PC.html>.; 2010.
9. Nieto PLE. Síntomas e identificación del agente causal del complejo pudrición del cogollo de palma de aceite, *Elaeis guineensis* Jacq. Revista Palmas (Colombia). 1996;71(2):57-60.
10. Gómez PL, Ayala L, Munévar F. Characteristics and management of Bud rot, a disease of oil palm. Proc Of the International Planters Conference, 17-20 May 2000: 545-553.
11. Sarria GA, Torres GA, Aya HA, Ariza JG, Rodríguez J, Vélez DC. Microorganismos asociados a la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite y su inoculación en palmas de vivero. Edición Especial, Palmas. 2008;29(3):27.
12. Agrios GN. Plant Pathology. Department of Plant Pathology University of Florida. 5th Edition. Elsevier Academia Press, USA. 2005. P. 921.
13. Gerlach W, Nirenberg H. The genus *Fusarium* a Pictorial Atlas. Institute für Mikrobiologie, Berlin-Dahlem. Berlin. 1982: 386.
14. Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. ASP Press. 1998; p.218.

15. Gamburg OL, Millar RA, Ojiva K. Nutrients requirements of suspension cultural of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 1968; 50: 148-151.
16. Jannatul F, Hanafi MM, Rafii MY, Kharidah M. A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. *African Journal of Biotechnology.* 2012;11(27):6956-6954.
17. Spanu P. HCf-1 a hydrophoben gene of *Cladosporium fulvum*, does not affect pathogenicity in tomato. *Physiol Mol Plant Pathol.* 1998;52:323-334.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1989.
19. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications.* 1990;18:315-322.
20. Mishra PK, Fox RTV, Culham A. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *Fems Microbiology letters* 218 (2003). Elsevier Science B.V. 2002; 329-332.
21. Lelliott RA, Stead DE. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Methods in Plant Pathology, Volumen 2, Series editor: TF Preece.* Published on behalf of the British Society for Plant Pathology by Blakwell Scientific Publications. Oxford London. 1987; 37-200 p.
22. Balmas V. Identificación morfológica de aislados de *Fusarium* spp. Comunicación personal. [20 abril, 2014].

Recibido: 2-12-2014.

Aceptado: 6-6-2015.