

***Fusarium* spp. asociados a la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Ecuador^{1,2}**

*Mayra Ronquillo-Narváez*³, *Consuelo Estévez de Jensen*⁴
y *Gustavo Bernal*⁵

J. Agric. Univ. P.R. 97(3-4):135-148 (2013)

RESUMEN

La pudrición del cogollo (PC) de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) es la enfermedad de mayor importancia en Panamá, Colombia, Ecuador y Brasil. La enfermedad se caracteriza por el amarillamiento de las hojas jóvenes y pudrición descendente de la hoja bandera que avanza hasta el meristemo apical causando la muerte de la palma. Con el objetivo de estudiar la etiología de la PC, en junio del 2011 se realizó un muestreo en siete plantaciones de palma aceitera de la provincia de Esmeraldas en Ecuador. Se aislaron varias especies de *Fusarium* a partir de tejido de cogollo, meristemo apical y raíces. La identificación se realizó mediante examen de características morfológicas y análisis de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se realizaron pruebas de patogenicidad y se completaron los Postulados de Koch por cada aislado en el Centro de Investigaciones de Palma Aceitera (CIPAL), La Concordia en Ecuador. Se utilizaron palmas de dos meses de edad del material CIRAD código 2504 y palmas híbridas O x G (*E. oleifera* x *E. guineensis*) consideradas como material susceptible y material tolerante, respectivamente. Las palmas se inocularon con 1 ml de una suspensión de 1×10^7 macroconidias por mililitro de *Fusarium* sp., *F. oxysporum* y *F. solani*. Las palmas utilizadas como grupo control se inocularon con 1 ml de agua destilada estéril. Cuatro días después de la inoculación con *F. oxysporum* y *F. solani*, aparecieron lesiones necróticas en la hoja más joven y 27 días después progresó a una pudrición descendente del cogollo en palmas CIRAD código 2504. Se reaislaron a *F. oxysporum* y *F. solani* y se identificaron mediante características morfológicas y PCR. Ambas especies, *F. oxysporum* y *F. solani*, están asociadas a la PC y pueden ser importantes en el desarrollo de la enfermedad en Ecuador.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, pudrición del cogollo, palma de aceite

¹Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 19 de septiembre del 2013.

²Los fondos de la investigación fueron provistos por la Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA) y la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de Ecuador.

³Estudiante Graduada, Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, P.O. Box 9000, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Mayagüez, P.R. 00680.

⁴Catedrática Asociada, Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, P.O. Box 9000, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Mayagüez, P.R. 00680.

⁵Director de Investigación, Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA), La Concordia, Ecuador.

ABSTRACT

Fusarium spp. associated with bud rot of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Ecuador

Bud rot is considered the most important disease of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Panamá, Colombia, Ecuador and Brazil. This disease is characterized by yellowing of young leaves and rot of the flag leaf progressing to the meristematic tissues causing palm death. With the objective of studying bud rot etiology, a survey was conducted during June 2011 in seven different oil palm plantations of the province of Esmeraldas, Ecuador. Sampling was carried out in seven palm plantations and *Fusarium* spp. were isolated from buds, leaves, meristem tips and roots. Fungal identification was achieved by examination of morphological characteristics and DNA analysis by polymerase chain reaction (PCR). Pathogenicity tests were performed and Koch Postulates were completed with each isolate at the Research Center for Oil Palm in Ecuador. Two-month-old oil palm plants were used for the experiment: CIRAD code 2505 and the hybrids O x G (*E. oleífera* x *E. guineensis*), considered susceptible and tolerant cultivars, respectively. The palms were inoculated with 1 ml of 1×10^7 macroconidia per milliliter of *Fusarium* sp., *F. oxysporum* and *F. solani*. Control palms were inoculated with 1 ml of sterile distilled water. After four days of inoculation with *F. oxysporum* and *F. solani*, necrotic lesions appeared on the youngest leaves; after twenty-seven days bud rot progressed on the CIRAD code 2504 palms. *Fusarium oxysporum* and *F. solani* were re-isolated and identified through cultural characterization and PCR. *Fusarium oxysporum* and *F. solani* were found associated with bud rot disease in Ecuador and can be important in the development of the disease.

Key words: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, bud rot, oil palm

INTRODUCCIÓN

La palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.), originaria de África Occidental, es un vegetal perenne (Corley y Tinker, 2009). Cuando se cultiva con propósitos comerciales tiene en promedio una vida útil entre 24 y 28 años, de acuerdo con el tipo de material sembrado (Bernal, 2001). De los frutos se extraen dos tipos de aceite: uno que se sustrae de la pulpa, el aceite de palma, y otro de la almendra, conocido como aceite de palmiste. En la fase industrial del cultivo se refinan y se fraccionan los aceites, para producir las oleínas y las estearinas de palma y de palmiste (Bernal, 2001). El aceite de palma es una materia prima importante y versátil, que puede utilizarse en productos como aceite vegetal de cocina, margarinas, detergentes, jabones, champús, cosméticos, ceras, pulimentos, entre otros (Clay, 2004).

Desde 2006 el aceite de palma se convirtió en la primera fuente de aceite vegetal en el mundo con 37 millones de toneladas en contraste con 36.25 millones de toneladas que produjo la soya. Para el 2007 se produjeron 40.7 millones de toneladas de aceite de palma versus 38.08 millones de toneladas de aceite de soya (Fairhurst y Härdter, 2012).

En Ecuador, el cultivo de la palma aceitera tiene gran importancia económica dentro de la producción agrícola del país, con una superficie sembrada de 248,199 hectáreas (Censo Palmero, Quito, Ecuador, 2005). Este crecimiento está acompañado de la generación de fuentes de empleo directo para 90,000 personas e indirecto para 50,000 adicionales, y genera 75,000 millones de dólares en exportaciones anuales. El 87% de los palmicultores son dueños de pequeñas áreas de cultivo con plantaciones menores a 50 hectáreas (Censo Palmero, Quito, Ecuador, 2005), lo que refleja el enorme impacto social del cultivo.

La pudrición del cogollo (PC) se considera la enfermedad de mayor importancia en la producción de palma aceitera en América del Sur y Central. En la zona Occidental de Colombia, entre los años 2007 y 2008 causó pérdidas en la producción de 16,700 hectáreas (Álvarez et al., 2010; Silva y Martínez, 2009). Los síntomas se caracterizan por una clorosis del cogollo (hojas jóvenes), pudriciones húmedas en los folíolos de la hoja bandera, extendiéndose por contacto físico (Franqueville, 2001). Cuando la pudrición alcanza el meristemo apical puede causar la muerte de la palma.

En Ecuador, la PC se presentó en 1979 en la vertiente amazónica y para 1992 a 1993 el ataque de la enfermedad fue devastador en las plantaciones de «Palmeras del Ecuador» en Shushufindi y «Palmorientes» en Huasito en la Provincia de Orellana. Estas plantaciones con más de 5,000 ha cada una están a una distancia de 190 kilómetros (Dzido et al., 1978, citado por Franqueville, 2001). Actualmente, San Lorenzo, Provincia de Esmeraldas, constituye el centro de la PC. En la amazonía ecuatoriana se estudió la microflora asociada a la PC y se encontraron principalmente hongos de los géneros *Phoma*, *Cephalosporium*, *Pirenochaeta*, *Pestalotia* y *Colletotrichum* (Quilic, 1983, citado por Sarria et al., 2008).

Recientemente, en Colombia se reportó a *Phytophthora palmivora* como agente causal de la PC. Plantas de ocho meses de edad inoculadas con el patógeno mostraron síntomas iniciales de la PC a los tres o cuatro días después de la inoculación, pero solo el 15% de las plantas inoculadas desarrollaron síntomas típicos de la PC bajo condiciones favorables (Torres et al., 2010). *Phytophthora palmivora* es uno de los patógenos más comunes, sin embargo, su presencia no explica plenamente el desarrollo de la PC, ya que también se encuentra en palmas que no han desarrollado síntomas de la PC (Fairhurst y Härdter, 2012). Además, la aplicación de fungicidas con acción específica para Oomycetes en palmas afectadas con PC no ha tenido resultados satisfactorios (Fairhurst y Härdter, 2012). La etiología de la pudrición del cogollo no ha sido estudiada con éxito en el Ecuador y es indispensable determinar él o los agentes causales para lograr establecer medidas

de control. La presencia de múltiples síntomas, la asociación con diferentes patógenos y la falta de estudios de factores edáficos que puedan contribuir al desarrollo de la enfermedad han contribuido al fracaso en la caracterización de la enfermedad.

Los objetivos de este estudio fueron identificar y caracterizar hongos y bacterias aislados a partir de tejido afectado por PC y determinar la patogenicidad de los principales microorganismos aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras y síntomas. Durante el mes de junio del 2011 se colectaron muestras de tejido afectado con pudrición del cogollo en las plantaciones: Aiquisa, Kayalú, Palesema, Palpailón, Palmeras de los Andes, Alespalma y Tabuche, ubicadas en San Lorenzo y Quinindé en la Provincia de Esmeraldas, Ecuador. Se cortaron palmas adultas con una motosierra y se realizó una disección en cada una para observar síntomas y signos. Se tomaron muestras de cuatro secciones de palmas adultas: cogollo, flecha, meristemo apical y raíces, seleccionando palmas dentro de la escala de severidad de 1 a 7. En donde, 1= planta aparentemente sana, sin síntomas visibles; 3= amarillamiento del cogollo, pequeñas lesiones necróticas en la flecha; 5= amarillamiento del cogollo, pudrición de flecha y cogollo; 7= hojas secas y pudrición del meristemo apical.

Aislamiento e identificación de hongos. Se realizaron aislados de 132 muestras de tejido colectadas, utilizando agar de papa y dextrosa acidulado (APDA) como medio de cultivo. Se realizaron cultivos monospóricos y de punta de hifa de los hongos aislados. Para la identificación de los hongos se utilizaron claves taxonómicas morfológicas para la clasificación de los diferentes géneros (Barnett y Hunter, 1998; Leslie y Summerell, 2006). Para el aislamiento de especies de *Phytophthora* se utilizó medio selectivo de agar maíz enmendado con pimarcina (0.02 g/L), ampicilina (0.27 g/L), rifampicina (0.02 g/L) y pentacloronitrobenzeno (100 mg/L) (PARP) (Singleton et al., 1992).

Prueba DAS-ELISA e ImmunoStrip para *Phytophthora*. Se utilizó una tira serológica para detectar especies de *Phytophthora* (*Phytophthora ImmunoStrip® Test*, Agdia Inc., Indiana, EE.UU.)⁶. La prueba se realizó en 35 muestras de raíz colectadas en el campo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Además, se analizaron secciones de tejido foliar (hoja bandera) y raíz con el *PathoScreen® ELISA* para

⁶Las marcas registradas se mencionan para proveer información específica. Su mención no constituye garantía ni endoso o preferencia de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico.

Phytophthora spp. (*Phytophthora* PathoScreen® Kit, Agdia Inc., Indiana, EE.UU.). La lectura de la reacción de las dos pruebas de serología se realizó visualmente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron cultivos monospóricos de *Fusarium* spp., aislados desde tejido de raíz y flecha. Para la extracción se tomaron 100 mg de micelio de siete días de crecimiento y se depositaron en un tubo Eppendorf de 2 ml de capacidad con cuatro esferas de cristal (Eppendorf AG Hamburg, Germany) de 5 mm de diámetro por cada tubo y se realizó la extracción de ADN utilizando el *DNeasy Plant Mini kit* (Qiagen, California, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La amplificación de la región ITS del ADN ribosomal se realizó con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Se utilizó un termociclador modelo T 3000 (Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 94° C durante un minuto, seguido de 35 ciclos a 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos y 72° C por un minuto, seguido de un ciclo final de extensión a 72° C por seis minutos (White et al., 1990; Vega, 2009). La visualización de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa (Sigma, St. Louis, EE.UU.) al 1.0%, teñido de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, EE.UU.). La purificación de productos del PCR se realizó utilizando el kit de purificación *QIAquick PCR Purification Kit Protocol* (Qiagen, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los productos de PCR purificados en una concentración de 20 ng se realizó a través de la compañía comercial MacroGen, Inc. en Rockville, EE.UU. (www.macrogenusa.com).

Pruebas de patogenicidad. Se utilizaron semillas germinadas de palma aceitera de la variedad CIRAD código 2504 y semillas germinadas híbridas O x G (*E. oleifera* x *E. guineensis*) (Murrin Corporation, Quinindé, Ecuador), considerados como material susceptible y material tolerante, respectivamente. En junio del 2012 en el Centro de Investigaciones de Palma Aceitera (CIPAL) en Ecuador se evaluaron trece aislados de *Fusarium* spp. en inoculación individual y combinada, y un testigo inoculado con agua destilada estéril (Cuadro 1). Los aislados se crecieron en medio APDA y se incubaron a 28° C durante siete días. Se preparó una suspensión de conidias de *Fusarium* spp. a una concentración de 1×10^7 UFC/ml. La inoculación se realizó luego de causar heridas con 10 pinchazos en la base de la hoja más joven utilizando una aguja de jeringa estéril. Cada planta de dos meses se inoculó con 1 ml de la suspensión de *Fusarium* spp. Las inoculaciones combinadas se realizaron utilizando las mismas concentraciones de conidias para *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* y con 1 ml de cada suspensión por planta.

CUADRO 1.—Sección de tejido y lugar de origen de los trece aislados de *Fusarium spp.* utilizados en las pruebas de patogenicidad en palma aceitera (*Elaeis guineensis*).

Aislado	Identificación	Sección	Origen del aislado
12	<i>F. solani</i>	raíz	Kayalú
28	<i>Fusarium sp.</i>	flecha ¹	Palpailón
50	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	Palmeras de los Andes
31	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	"
32	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	"
87	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	"
90	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	"
84	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	"
94	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	Kayalú
65	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	Tabuche
69	<i>Fusarium sp.</i>	flecha	Palpailón
70	<i>F. oxysporum</i>	raíz	Palpailón
70+12	<i>Fusarium spp.</i>	raíz	Palpailón, Kayalú
70+69	<i>Fusarium spp.</i>	raíz, flecha	Kayalú, Palpailón
62+12	<i>Fusarium spp.</i>	base peciolar, raíz	Palesema, Kayalú
69+87	<i>Fusarium spp.</i>	flecha	Palpailón, Palmeras de los Andes
Control	—	—	agua estéril

¹Se conoce como flecha a la hoja nueva sin abrir de la palma aceitera.

Reaislamiento de *Fusarium spp.* Se realizaron aislados desde el tejido sintomático de las plantas de palma aceitera inoculadas en medio APDA. Las especies de *Fusarium* se diferenciaron por medio de características culturales y morfológicas: crecimiento micelial, presencia y tamaño de macro y microconidias, tipo de conidióforo y clamidosporas. En las inoculaciones combinadas se realizaron transferencias desde micelio luego de tres días de la incubación y caracterización de micelio en color y velocidad de crecimiento en APDA. Los aislados se identificaron a base de características morfológicas descritas en el Manual de Identificación de especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). La extracción de ADN de los hongos aislados se realizó de acuerdo con la metodología descrita para su identificación molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recolección de muestras y síntomas. Las palmas presentaron diversos grados de severidad y síntomas: amarillamiento de las hojas jóvenes, necrosis de la flecha y pudrición a nivel de la base del raquis, y pudrición descendente de la estipe; escasas raíces cuaternarias y necrosis de las mismas. No hubo síntomas aparentes en el sistema vascular. En presencia de pudrición de la flechas se observó pudrición

acuosa del tejido basal avanzando hacia las bases peciolares y el punto de crecimiento. En palmas de cinco años (Deli x Ghana) en Aiquisa, la enfermedad estuvo dispersa, las palmas afectadas presentaban amarillamiento de las hojas jóvenes o cogollo, acompañado de necrosis y pudrición descendente de flecha hasta el meristemo apical; en palmas con daño inicial la pudrición no alcanzó el meristemo. En Kayalú, la enfermedad estuvo generalizada, las palmas mostraron síntomas típicos de amarillamiento del cogollo y pudrición descendente de la flecha. Las palmas sin amarillamiento del cogollo presentaban necrosis en diversas áreas de la flecha. En cuanto al sistema radicular, las raíces cuaternarias fueron escasas, quebradizas y mostraron necrosis; en las palmas muestreadas fue notoria la reducción de raíces absorbentes. En Palesema con material Coari x Lamé y *guineensis*, los síntomas se caracterizaron por pudrición severa del cogollo acompañado de mal olor; el sistema radicular presentó necrosis y escaso desarrollo. En la plantación Palpailón se observó muerte de las palmas afectadas, amarillamiento del cogollo, con pudrición avanzada que ocasionó maceración de tejidos del meristemo, con mal olor. En el Cantón Quinindé en la plantación Tabuche sembrado con material *guineensis*, la enfermedad estuvo distribuida de manera uniforme, la mayoría de las palmas del lote muestreado presentaron síntomas de amarillamiento del cogollo, y pudrición de la flecha con doblamiento.

CUADRO 2.—Frecuencia de aislados de hongos a partir de tejido con pudrición del cogollo en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) en la Provincia de Esmeraldas, Ecuador.

Hongo	No. Aislados	Porcentaje	Estructura afectada
<i>Acremonium</i> spp.	1	1.20	flecha
<i>Alternaria</i> spp.	4	4.82	flecha, foliolos del cogollo, raíz
<i>Cladosporium</i> spp.	3	3.61	flecha, foliolos del cogollo
<i>Colletotrichum</i> spp.	7	8.43	flecha, raíz
<i>Curvularia</i> spp.	5	6.02	flecha, foliolos del cogollo, raíz
<i>Diaporthe</i> spp.	1	1.20	flecha
<i>Fusarium</i> spp.	30	36.59	flecha, foliolos del cogollo, raíz
<i>Nigrospora</i> spp.	2	2.41	flecha, raíz
<i>Pestalotia</i> spp.	6	7.23	base de los foliolos, raíz
<i>Phoma</i> spp.	2	2.41	foliolos del cogollo, raíz
<i>Polypore</i> spp.	1	1.20	flecha
<i>Trichoderma</i> spp.	15	18.07	raíz
Micelio estéril	5	6.02	foliolos del cogollo, raíz
Total	82	100.00	

Hongos asociados a la pudrición del cogollo. Se obtuvieron 82 aislados fúngicos (Cuadro 2), el 36.59% de los hongos aislados correspondieron a *Fusarium* spp. Otros géneros aislados fueron *Colletotrichum* spp. (8.43%), *Pestalotia* spp. (7.23%), *Curvularia* spp. (6.02%) y *Alternaria* spp. (4.82%). La mayoría de los hongos fueron identificados a nivel de género, basados principalmente en las estructuras de reproducción. Estos resultados concuerdan con los estudios de microorganismos asociados a la pudrición del cogollo en Colombia, siendo los más frecuentes *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. (Sarria et al., 2008). En medio de cultivo selectivo PARP no se aisló *Phytophthora* a partir de tejido de flecha, cogollo o raíces de palma. Sin embargo, se detectó a *Phytophthora* por medio de tira serológica desde muestras de raíces. Este resultado contrasta con los estudios de Colombia donde se reporta a *Phytophthora palmivora* como el agente causal de la pudrición del cogollo (Torres et al., 2010).

En medio APDA todos los aislamientos de *F. oxysporum* tuvieron rápido crecimiento de micelio aéreo y blanco, que se tornó púrpura con el tiempo (Figura 1). Las microconidias fueron producidas en falsas cabezas de $5.53 \pm 0.68 \mu\text{m}$ de largo y $2.61 \pm 0.35 \mu\text{m}$ de ancho. Las macroconidias fueron de forma curva con tres a cinco septas de $31.05 \pm 6.75 \mu\text{m}$ de largo y $3.17 \pm 0.72 \mu\text{m}$ de ancho y se formaron en monofálidos cortos (Figura 1). En medio de cultivo APDA *F. solani* presentó micelio blanco cremoso poco abundante y formó esporodoquios (Figura 2). Las características distintivas fueron: microconidias de $11.36 \pm 1.41 \mu\text{m}$ de largo y $4.45 \pm 0.58 \mu\text{m}$ de ancho, y las macroconidias de pared gruesa de $30.81 \pm 2.95 \mu\text{m}$ de largo y $5.44 \pm 0.48 \mu\text{m}$ de ancho. De acuerdo con Leslie y Summerell (2006), los cultivos de *F. solani* en medio papa dextrosa agar usualmente son de color blanco a crema con micelio escaso.

Pruebas de serología para *Phytophthora*. De las 35 muestras de raíces colectadas en las plantaciones de palma aceitera (Cuadro 3), se determinó la presencia de *Phytophthora* spp. en dos muestras colectadas en la plantación Palmeras de los Andes y Palesema con escala de severidad 1 (aparentemente sana) y 3 (amarillamiento del cogollo), respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Fairhurst y Härdter (2012), quienes mencionan que *Phytophthora palmivora* es uno de los patógenos más comunes que ocurren en la raíz. En muestras de tejido de flecha y base de los folíolos no se detectó a *Phytophthora* spp. en ninguna de las muestras analizadas. En Aiquisa las pruebas de serología realizadas fueron negativas para *Phytophthora* sp.

Identificación molecular de *Fusarium oxysporum* y *F. solani*. Se realizó la identificación molecular de nueve aislados de *Fusarium*

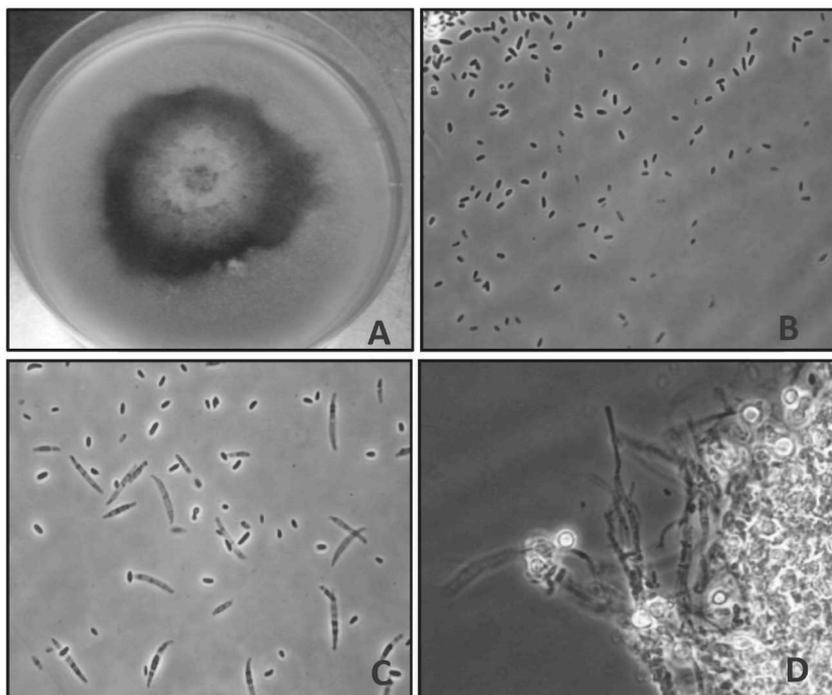


FIGURA 1. A) Cultivo de *Fusarium oxysporum* en medio APDA; B) Microconidias; C) Macroconidias y microconidias y D) Clamidosporas. (B, C y D. Microscopio en contraste de fase, lente 40x)

codificados como: 41, 54, 50, 68, 90, 42, 12, 84 y 70 (Cuadro 3). En todos los aislados se obtuvo una banda de ADN con 500 pares de bases (pb) producto de la amplificación con los cebadores ITS1 e ITS4, lo que corresponde al peso molecular de la región ITS del ADN ribosomal de hongos utilizando cebadores universales, el cual está enmarcado entre 500 y 570 pb (Abd-Elsalam, 2003). Las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de los aislados de *Fusarium* comparadas con las secuencias depositadas en el Gen Bank (Cuadro 3), a través del BLAST, correspondieron a diferentes especies de *Fusarium*. Los aislados 12 y 70, con número de acceso al Gen Bank JX896998 y JX897002, mostraron un porcentaje de homología del 100% con las secuencias de *F. solani* y *F. oxysporum*, respectivamente (Cuadro 4). Los aislados 54 y 68, con número de acceso al Gen Bank JX897000 y JX897001, mostraron un porcentaje de homología del 99% con las secuencias de *F. solani*. Los resultados demuestran la predominancia de aislados de *F. oxysporum*

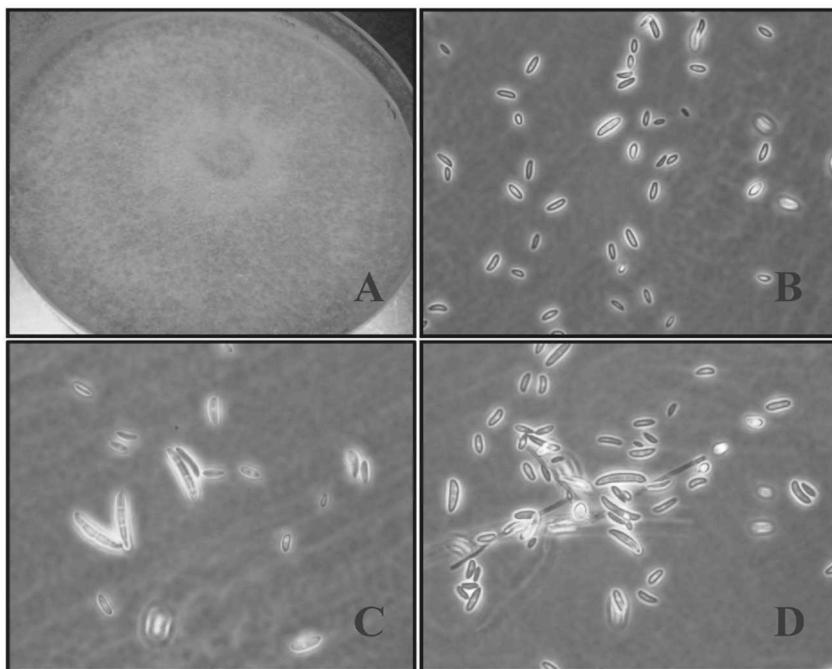


FIGURA 2. A) Cultivo de *Fusarium solani* en medio APDA; B) Microconidias; C y D) Macroconidias y microconidias. (B, C y D. Microscopio en contraste de fase, lente 40x)

y *F. solani* en tejido de palma aceitera con síntomas de pudrición del cogollo. Varios estudios sobre microorganismos asociados a la PC han postulado a *F. solani* y *F. oxysporum* como causantes de la enfermedad (Figueroa, 1977; Renard, 1991; Nieto y Gómez, 1991; Buitrago, 1993. Citados por Bastidas y Enríquez, 2008).

Pruebas de patogenicidad con *F. oxysporum* y *F. solani*. En palmas del material susceptible CIRAD código 2504 inoculado con los aislados de *F. oxysporum*, *F. solani*, y su combinación, se observaron diferencias en cuanto a síntomas desarrollados al ser comparadas con el control. En las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* (aislado 70) se observó síntomas de necrosis en la hoja más joven después de cuatro días de la inoculación (Figura 3A). Los síntomas incluyeron amarillamiento de las hojas y pequeñas lesiones en la hoja más joven. Luego de 27 días de la inoculación los síntomas progresaron sin descender al cogollo (Figura 3B). Después de dos meses, los síntomas no avanzaron y hubo emisión de hojas nuevas. El hecho que el aislado de *F. oxysporum* causó lesiones y pudrición descendente en la hoja más

CUADRO 3.—Identificación molecular de especies de *Fusarium* aislados a partir de tejido de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) con PC, utilizando la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal y el programa BLAST.

Datos del aislado		Identificación en GenBank		
Número de acceso GenBank ¹	Aislado	Descripción	Cobertura (%)	Homología (%)
JX896998	12	<i>Fusarium solani</i>	100	100
JX896995	41	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	99
JX896999	42	<i>Fusarium</i> sp.	99	98
JX896996	50	<i>Fusarium</i> sp.	99	99
JX897000	54	<i>Fusarium solani</i>	99	99
JX897001	68	<i>Fusarium solani</i>	99	99
JX897002	70	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	100
JX897003	84	<i>Gibberella moniliformis</i>	100	99
JX896997	90	<i>Fusarium equiseti</i>	100	99

¹Código asignado en GenBank para la secuencia reportada

joven demostró su patogenicidad. En palma aceitera, *F. oxysporum* está asociado a la enfermedad pudrición del cogollo. En el Ecuador es probable que la PC sea causada por un complejo de patógenos, entre ellos *Fusarium* spp., para que la enfermedad resulte letal. En la Estación Experimental Santo Domingo, del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP), Chávez (1986) concluyó que *Fusarium oxysporum* y *F. roseum* estaban asociados con la PC.

Las plantas inoculadas con *Fusarium solani* (aislado 12) presentaron síntomas de necrosis en la hoja más joven con amarillamiento del resto de las hojas (Figura 3C). Los síntomas no progresaron en el transcurso de los dos meses de evaluación (Figura 3D). En Sibiti, en el Congo-Brazzaville, Bachy (1954), citado por de Franqueville (2001), reportó una fuerte asociación entre la pudrición del cogollo, las bacterias y especies de *Fusarium*, principalmente *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. roseum*. Por otra parte, Franqueville (2001) inoculó *Fusarium* a nivel del suelo en la fase de plántula y posteriormente inoculó una suspensión bacteriana a nivel de la flecha; estas inoculaciones no reprodujeron los síntomas de la PC (Franqueville, 2001).

Las inoculaciones combinadas de *F. oxysporum* y *F. solani*, presentaron amarillamiento de las hojas y lesiones necróticas en la hoja más joven y no progresaron durante el periodo de evaluación. El efecto de la inoculación combinada de estos patógenos no fue letal en las plantas, sin embargo, los síntomas se observaron a los cuatro días de la inoculación. Según Chinchilla (2010), las pudriciones del cogollo no son

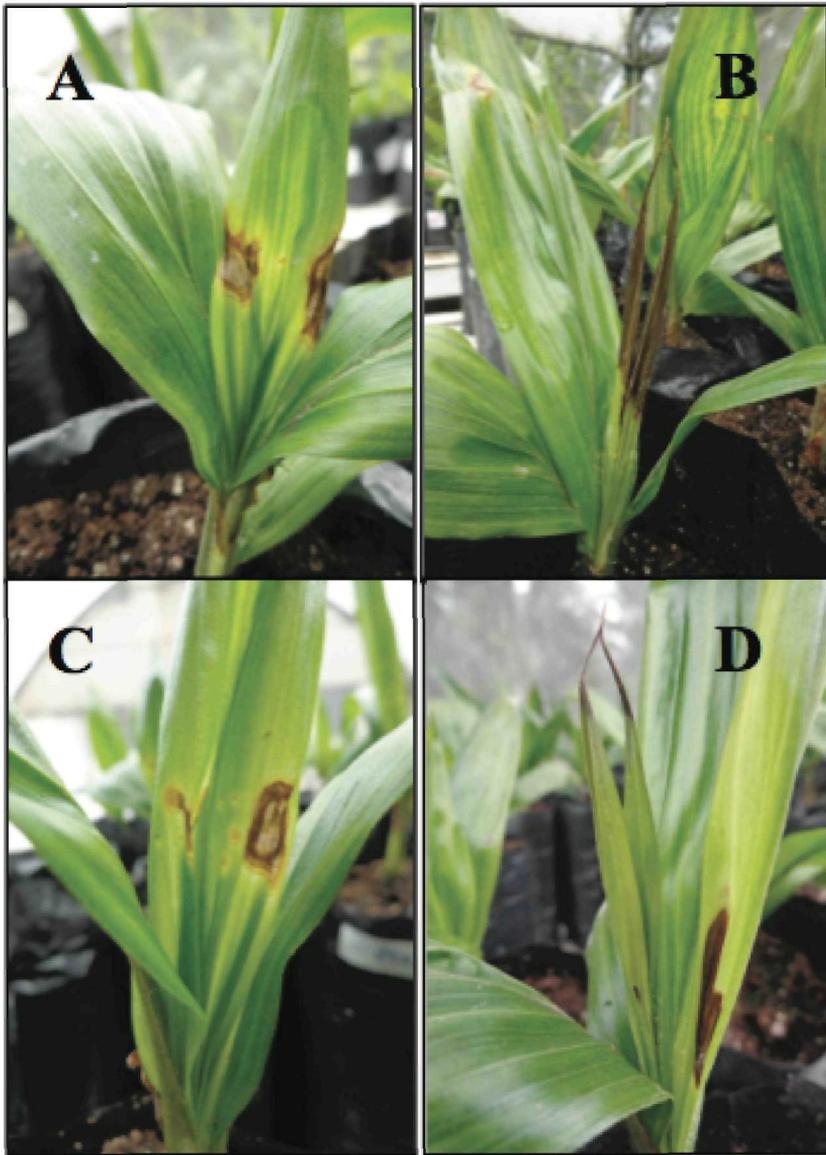


FIGURA 3. Pruebas de patogenicidad con *F. oxysporum* (aislado 70) en palmas CIRAD código 2504. A) Necrosis en la hoja más joven después de cuatro días de la inoculación; B) Pudrición descendente de la hoja más joven después de 27 días de la inoculación. Pruebas de patogenicidad con el aislado 12 de *F. solani* en palmas CIRAD código 2504. C) Necrosis en la hoja más joven después de cuatro días de la inoculación; D) Pudrición descendente de la hoja más joven después de 27 días de la inoculación.

necesariamente letales, y una proporción variable de las plantas (que puede ser cercana a 100%) puede recuperarse de los síntomas.

En el material tolerante híbrido O x G únicamente el aislado 70 de *F. oxysporum* presentó diferencias al ser comparado con el control. La escala de severidad correspondió a 3 debido a la presencia de lesiones necróticas en la hoja más joven. Las lesiones causadas por *F. oxysporum* en material CIRAD código 2504 y en material tolerante híbrido fueron diferentes. Mientras que *F. oxysporum* causó síntomas con severidad 5 en el material CIRAD, en el híbrido O x G la severidad fue 3. Análogo a lo publicado por Chinchilla (2010), 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. Además, en el Oriente Ecuatoriano, Franqueville (2001) pudo constatar esporádicamente la presencia de síntomas de la PC en los híbridos interespecíficos O x G.

Reaislamiento de *F. oxysporum* y *F. solani*. Los hongos *F. oxysporum* y *F. solani* fueron aislados de plantas inoculadas individualmente, comprobando su patogenicidad en plantas de palma aceitera de dos meses de edad. Estos hongos causaron lesiones necróticas y pudrición descendente de la hoja más joven. Los aislamientos a partir de tejido sintomático producto de la inoculación y el estudio de las características morfológicas, corroboró la presencia de ambas especies, *F. oxysporum* y *F. solani*, en el tejido.

La colección de muestras realizada no permitió demostrar que *Phytophthora palmivora* sea el agente causal de la pudrición del cogollo en la palma aceitera en la zona del estudio ya que no se logró aislar desde palmas con síntomas de la enfermedad. Sin embargo, se identificó a *Fusarium oxysporum* y *F. solani* en tejido sintomático de hoja bandera y luego de estos ser inoculados produjeron lesiones necróticas en el tejido de palmas jóvenes. Además, se identificó a bacterias del género *Erwinia* en tejido de cogollo con pudrición.

LITERATURA CITADA

- Abd-Elsalam, K., I. Aly, M. Abdel-Satar, M. Khalil y J. Verreet, 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Afr. J. Biotechnol.* 2(4): 82-85.
- Álvarez, E., M. Marroquín-Guzmán, J. F. Mejía y J. M. Pardo, 2010. Early detection of *Phytophthora palmivora* in oil palm, using real-time polymerase chain reaction (QPCR) and molecular beacon probes. *Phytopathology* 101: S253.
- Barnett, H. L. y B. B. Hunter, 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press. p. 218.

- Bastidas, E. y G. Enríquez, 2008. Caracterización morfológica de palmas de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) enfermas con pudrición de cogollo en la zona palmera occidental. Tesis. Universidad de Nariño, Colombia. p. 78.
- Bernal, F., 2001. El cultivo de la palma de aceite y su beneficio: Guía para el nuevo palmicultor. Fedepalma y Cenipalma, Colombia. p. 12.
- Censo Palmero, 2005. Asociación Nacional de Palma Aceitera (ANCUPA), Fundación de Fomento de Exportaciones de Aceite de Palma y sus Derivados de Origen Nacional (FEDEPAL), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Sistema de Información Geográfica y Agropecuaria (SIGAGRO). Quito, Ecuador.
- Chávez, F., 1986. Enfermedades de la palma africana en Ecuador y su nombre. INTAP. Manual No. 8. p. 19.
- Chinchilla, C., 2010. 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/espanol/articulos/Guia-PC.html>
- Clay, J. W., 2004. World agriculture and the environment: A commodity-by-commodity guide to impacts and practices. Island Press. USA. p. 204
- Corley, R. y P. Tinker, 2009. La palma de aceite. Cuarta edición. Blackwell Publishing. Oxford, UK. p. 604.
- Fairhurst, T. y R. Härdter, 2012. Palma de aceite: Manejo para rendimientos altos y sostenibles. Primera Edición en Español. p. 404.
- Franqueville, H. De, 2001. La pudrición del cogollo de la palma de aceite en América Latina. Revisión Preliminar de Hechos y Logros Alcanzados. CIRAD, p. 35
- Leslie, J. F. y B. A. Summerell, 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing. p. 369.
- Sarria, G., G. Torres, H. Aya, J. Ariza, J. Rodríguez, D. Vélez, F. Varón y G. Martínez, 2008. Microorganismos asociados a la pudrición del cogollo de la palma de aceite y su inoculación en palmas de vivero. *Palmas* 29 (3): 19-29.
- Silva, A. y G. Martínez, 2009. Plan nacional de manejo de la pudrición del cogollo. Fedepalma – Cenipalma. Bogotá, D.C. p. 2.
- Singleton, L., J. Mihail y C. Rush, 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press. p. 254.
- Torres, G. A., G. A. Sarria, F. Varon, M. D. Coffey, M. L. Elliott y G. Martínez, 2010. First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on african oil palm in Colombia. *Plant Disease* 94 (9): 11.
- Vega, B. P., 2009. Etiología de la roya americana de la soya, *Phakopsora meibomia* Arthur, en Puerto Rico. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico. p. 119.
- White, T., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *En: PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, New York, EE.UU. p. 315-322.