

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DE COGOLLO EN PALMA DE ACEITE MEDIANTE EL SISTEMA BIOLOG.

Vega, Edison¹, Taipe, Marco², Duchicela, Jessica³

RESUMEN

La investigación se realizó en Palmeras de los Andes San Lorenzo, en los sectores de Najurungo y Chanul 2, con el propósito de identificar, determinar y comparar la cantidad y diversidad de bacterias y hongos fitopatógenos presentes en los tejidos de meristema, flecha y raíz en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) afectadas con pudrición de cogollo. Para alcanzar los objetivos de esta investigación, se muestreo dos plantas enfermas por cada grado de severidad y dos sin síntomas, se realizó aislamientos de bacterias y hongos, que fueron evaluados mediante criterios morfológicos, luego fueron agrupados en dendogramas utilizando la medida de similitud de Bray Curtis. Posteriormente, se hizo la identificación de especies de bacterias y de hongos, mediante el sistema de identificación Biolog. La cantidad y biodiversidad de cada una de las especies encontradas, fueron evaluadas utilizando el programa estadístico BioDiversity Pro versión 2. De las especies bacterianas encontradas, *Bacillus Pumilus* y *Pantoea agglomerans*, tienen mayor cantidad y diversidad biológica en las dos variedades de palma aceitera. Así mismo, los hongos fitopatógenos de mayor importancia que se obtuvo son: *Colletotrichum* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium decemcellulare* Brick, *Fusarium solani*, *Fusarium udum* E. Butler. en (*Elaeis guineensis* Jacq.) y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*), fueron *Colletotrichum* spp. y *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell.

Palabras clave: *Diversidad Biológica, Sistema Biolog, Palma de Aceite, Pudrición de Cogollo.*

ABSTRACT

The research was carried out in Palmeras de los Andes, San Lorenzo, around the Najurungo and Chanul 2 areas, with the purpose of identifying, determining and comparing the amount and diversity of bacteria and phytopathogenic fungi present in meristem, spear and root tissues in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and in its interspecific hybrid (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) affected by bud rot. To accomplish the objectives of this research, two diseased plants for each degree of severity and two without symptoms were sampled, bacterial and fungal isolates which were evaluated by morphological criteria were performed, then they were grouped into dendrograms using the Bray-Curtis similarity measure. Later, species of bacteria and fungi were identified by the BIOLOG Identification System. The quantity and biodiversity of each found species were evaluated using the statistical program BioDiversity Pro 2.0. Among the bacterial species obtained, *Bacillus Pumilus* and *Pantoea agglomerans* have the greatest quantity and biodiversity in both oil palm varieties. Also, phytopathogenic fungi of greatest importance that were obtained were: *Colletotrichum* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium decemcellulare* Brick, *Fusarium solani*, *Fusarium udum* E. Butler. in (*Elaeis guineensis* Jacq.) and in the interspecific hybrid (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) they were: *Colletotrichum* spp. and *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell.

Key words: *Biodiversity, Biolog system, Oil palm, Bud rot.*

"Este trabajo se lo realizó con el financiamiento de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad – AGROCALIDAD, con el apoyo de Palmeras de los Andes San Lorenzo y la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Laboratorio de Biotecnología".

¹Edison Vega, Ingeniero en Biotecnología, Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad – Agrocalidad, Laboratorio de Fitopatología, Km 14^{1/2} Vía Interoceánica, La Granja, MAGAP, (e-mail: edisonvehi@hotmail.com).

²Marco Taipe, Ing. Agr. profesor de la Universidad de las Fuerzas Armadas, Carrera de Biotecnología, Gral. Rumiñahui s/n. (e-mail: mvtaipe@espe.edu.ec).

³Jessica Duchicela, PhD, profesora de la Universidad de las Fuerzas Armadas, Carrera de Biotecnología, Gral. Rumiñahui s/n. (e-mail: jiduchicela@espe.edu.ec).

INTRODUCCIÓN

La producción de aceite de palma africana se ha convertido en estos últimos años en una de las principales actividades económicas del país siguiéndole a la exportación petrolera, bananera, camaronera, y floricultora [1].

El incremento del área cultivada con palma africana (*Elaeis guineensis* Jac.) ha provocado problemas de origen patológico afectando al sector palmicultor, por esta razón varias instituciones tanto nacionales como internacionales, han hecho esfuerzos para determinar la causa. La enfermedad conocida como pudrición de cogollo (PC) se ha convertido en una de las principales limitaciones en el cultivo de la palma de aceite en algunas zonas palmeras del país.

En Ecuador existe poca información acerca del estudio de las enfermedades que afectan a la palma de aceite específicamente la pudrición de cogollo la cual es una de las principales razones para que se reduzca la producción palmicultora, afectando económicamente a las plantaciones ecuatorianas, he ahí la importancia de esta investigación para aumentar el conocimiento sobre dicha enfermedad.

Si es cierto que se conocen algunas características de esta enfermedad pero hasta el momento no se ha podido identificar sus causantes o complejo PC (Pudrición de Cogollo), por lo tanto desde un punto de vista práctico, no es posible desarrollar métodos de detección sensibles y precisos que permitan controlar esta enfermedad. Solo continuando con las investigaciones se podrá desarrollar y validar estrategias de manejo que eviten su diseminación a otras regiones palmeras del país y disminuir las pérdidas económicas que esta representa [2].

En la actualidad debido a que no existe ningún control sobre esta enfermedad, se espera que el impacto económico en la producción sea cada vez más significativo, por lo que se está proponiendo soluciones a través del mejoramiento genético.

Palmera de los Andes está dirigiendo su investigación a la obtención de un material *Guinnensis* con las características del híbrido (O x G), el cual presenta mejor calidad de aceite, crecimiento y resistencia a enfermedades, sin embargo la pudrición de cogollo lo está afectando, por lo que se están realizando estudios para ver el progreso de la enfermedad en este nuevo cultivo.

La sintomatología de la PC ha sido descrita por varios autores, generalmente en sus zonas respectivas de intervención. Hay una sintomatología general bastante constante en las fases tempranas del desarrollo de la enfermedad, pero ella se puede desarrollar en forma diferente dependiendo de la vitalidad del avance de la pudrición hacia el meristema y la facultad de recuperación de los síntomas observados [3].

Los primeros síntomas se expresan por una clorosis en las hojas jóvenes, luego existen pudriciones más o menos húmedas bajo los folíolos de las hojas de la flecha, extendiéndose por contacto de un folíolo al otro. En la base de

estas hojas aparecen a continuación un desorden de los tejidos que se extiende hasta los puntos de crecimiento.

Esta investigación tuvo como objetivos:

- Identificar bacterias y hongos fitopatógenos según el grado de severidad que presenten las palmas aceiteras (*Elaeis guineensis* Jacq.) y el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) afectadas con pudrición de cogollo.
- Comparar y analizar la cantidad y diversidad de hongos y bacterias en tejidos de tallo, hoja y raíz de las palmas aceiteras.
- Establecer un cepario con los hongos y bacterias, posibles causantes de la pudrición de cogollo en palmas aceiteras (*Elaeis guineensis* Jacq.) y el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Los resultados obtenidos beneficiarán a los palmicultores ecuatorianos, porque permitirá mejorar el plan de manejo fitosanitario contra esta enfermedad.

METODOLOGÍA

Localización Geográfica.

El proyecto se desarrolló en dos sitios:

Trabajo de campo: Se realizó, en el sector de Najurunjo y Chanul 2 con coordenadas N: 0745585; S: 0134590 y N: 152040; S: 857983 respectivamente, en Palmera de los Andes San Lorenzo, ubicada en el Km 14 vía San Lorenzo Mataje en la Provincia de Esmeraldas.

Trabajo de laboratorio: Se efectuó en los laboratorios de AGROCALIDAD, en el área de Fitopatología, ubicada en el Valle de Tumbaco, (Vía Interoceánica Km 14 ½ - La Granja) al nororiente del cantón Quito, provincia de Pichincha.

Procedimiento

Muestreo.

Se tomaron muestras de tallo, hoja, raíz, de 2 plantas adultas *Elaeis guineensis* Jacq y del híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), se observaron los síntomas de la enfermedad de acuerdo con la escala de severidad desarrollada por Cenipalma y Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero (2009).

Traslado de muestras

Las muestras fueron trasladadas en bolsas de polietileno, envueltas en papel periódico, identificadas con códigos y colocadas correctamente en el recipiente térmico, a una temperatura de 4° C [4].

Procesamiento de las muestras

Se seleccionó muestras de meristema, flecha y raíz, se pesó 10g de cada uno de ellos. Posteriormente, en la desinfección se utilizó hipoclorito de sodio al 2% por 20 segundos, lavando tres veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de cloro [5].

Se cortaron trozos pequeños de las muestras, estos a su vez fueron triturados en un mortero dentro de la cámara de flujo laminar, para luego ser colocados en vasos de precipitación con 90ml de agua destilada estéril, dejando reposar por un tiempo de 45 minutos para que los microorganismos se difundan [5].

Con una pipeta estéril de 1 ml, se transfirió la suspensión de microorganismos a tubos de ensayo con agua peptonada, hasta obtener diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} . Se agregó, para el caso de bacterias 0.5 ml con una pipeta estéril en medios de cultivo YDC y King B, por cada dilución se hizo tres repeticiones. Para el recuento de colonias de hongos se añadió 0.5 ml de la dilución 10^{-3} en medio de cultivo PDAac (Agar papa dextrosa con ácido láctico y cloranfenicol) [6].

Para el aislamiento de hongos, se colocaron trozos pequeños de la muestra en cada cuadrante de la caja Petri con medio PDAac y se dejó en la estufa, esto se realizó en dos repeticiones [6].

Una vez colocada la suspensión bacteriana en los respectivos medios de cultivo, estos fueron incubados a una temperatura de 33°C por 24 horas y para hongos se dejó a una temperatura de 28°C por 7 días [6].

Posteriormente, se purificaron las bacterias en Agar Nutritivo, momento en el cual se procedió a contar cada una de las colonias en un contador de colonias Quebec [5].

Después de la purificación, las colonias se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas, tales como: Oxidasa, Catalasa, Metabolismo Oxidativo/Fermentativo, prueba KOH, tinción Gram, Motilidad y Licuefacción, [7].

Para hongos se realizó el proceso de identificación mediante la observación al microscopio y utilización de claves taxonómicas [8]. La purificación de hongos se realizó en la cámara de flujo laminar, para esto se utilizó palillos de dientes estériles y se tomó un poco de micelio de los hongos para luego ponerlos en medio de cultivo de PDAac [9].

Para el análisis de hongos en el sistema Biolog, se dio preferencia a los hongos de mayor importancia fitosanitaria. En este caso se procedió a analizar al género *Fusarium*, para el cual se preparó el medio de cultivo SNA permitiendo comprobar que lo aislado en PDAac era *Fusarium*.

Identificación de hongos y bacterias mediante el sistema Biolog

Para la identificación de hongos fitopatógenos a nivel de género y de especie, para aquellos con mayor importancia fitosanitaria (*Fusarium* spp.) en las dos variedades de palma aceitera. Debido a que en el resultado previo, se identificaron hongos saprofitos tales como, *Penicilium* spp., *Trichoderma* spp., no fueron considerados para el análisis en el sistema Biolog. Así mismo, no se consideraron los demás hongos fitopatógenos, por que no se encontraban en la base de datos del equipo.

Se procedió a calibrar el turbidímetro con tubos de ensayo, los cuales tenían el reactivo IFA para bacterias y FF para hongos a una transmitancia de 75% y 85% respectivamente. Posteriormente, se colocó con una multipipeta las suspensiones bacterianas en las placas Gen III y las suspensiones de hongos en las placas Fungi-Fungi, después se realizó la lectura para bacterias cada 24 horas. Para la lectura de hongos se realizó por 7 días cada 24 horas [10].

Para la preparación de la suspensión de hongos, se utilizó la técnica denominada “tubo seco”, la cual consistió en colocar y triturar con una varilla de vidrio el micelio en un tubo seco. Se colocó 6ml del reactivo FF en este tubo y se dejó reposar treinta minutos. Luego, se calibro a una turbidez del 75% [11].

Conservación de bacterias

Las bacterias que se identificaron con el sistema Biolog fueron conservadas en caldo nutritivo y glicerol al 20%, posteriormente se hizo 6 repeticiones en tubos eppendorf y se las coloco en el congelador a -35°C [12].

Conservación de hongos

Los hongos identificados fueron conservados con sacarosa al 10%, peptona al 20% y papel filtro, el cual una vez que absorbió el micelio disuelto en la solución, fue colocado en tubos eppendorf, realizando 6 repeticiones por cada tipo de hongo [12].

Preparación de microcultivos

Esta técnica se realizó con el objetivo de que el micelio no se fragmente al momento de mirarlo al microscopio, permitiendo realizar medidas de las esporas de los hongos, mediante la utilización del microscopio Olympus BX43, equipado con el software cellSens 1.9_en_02_Krishna_16 August 2013.

RESULTADOS

Fase 1: Identificación Bacteriana

Caracterización morfológica e identificación de especies bacterianas en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq.

En palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.), fueron aisladas y seleccionadas 19 cepas bacterianas, estas se obtuvieron de plantas sanas (grado cero) y de plantas enfermas (grados 1 al 5). Posteriormente, se realizó un análisis de Grupos con el software estadístico BioDiversity Pro, versión 2 según el porcentaje de similitud de las pruebas bioquímicas (Figura 1).

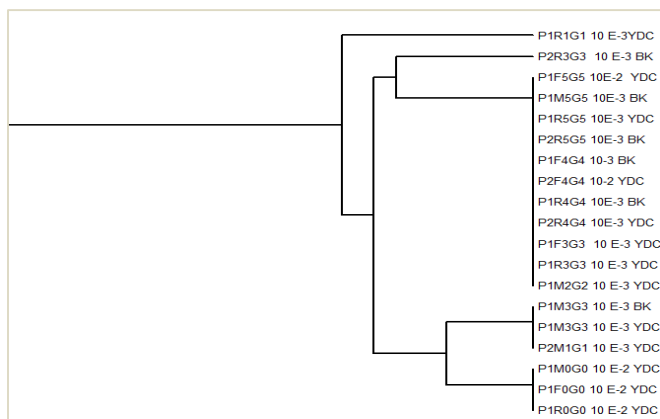


Fig.1. Dendrograma de similaridad de bacterias asociadas a la pudrición de cogollo en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq, utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.

Caracterización morfológica e identificación de especies bacterianas en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

En el híbrido interespecífico, se obtuvo un total de 12 cepas bacterianas, de plantas sanas (grado cero) y de plantas enfermas (grados 1 al 2). Se realizó un análisis de Grupos con el software estadístico BioDiversity Pro, versión 2 (Figura 2).

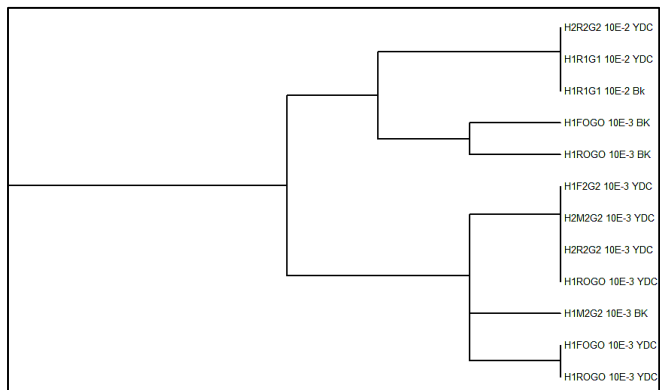


Fig.2. Dendrograma de similaridad de bacterias asociadas a la pudrición de cogollo en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.

El sistema de identificación Biolog, permitió identificar las cepas bacterianas descritas en la Tabla I.

TABLA I
ESPECIES BACTERIANAS

Especies bacterianas en <i>Elaeis guineensis</i> Jacq	
CÓDIGO	ESPECIE
P1R1G1	<i>Pseudomonas fulva</i>
P1R3G3	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
P1R5G5	<i>Bacillus pumilus</i>
P1M3G3	<i>Pantoea agglomerans</i>
P1M0G0	<i>Acinetobacter ursingii</i>
Especies bacterianas en el híbrido interespecífico	
H1F0G0	<i>Pseudomonas viridilivida</i>
H1R1G1	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>
H1F0G0	<i>Pantoea agglomerans</i>
H1R0G0	<i>Micrococcus lylae</i> C
H1M2G2	<i>Paenibacillus taichungensis</i>
H1F2G2	<i>Bacillus pumilus</i>

P: variedad *Elaeis guineensis* Jacq., H: híbrido interespecífico, R: raíz, M: meristemo, F: flecha, G: grado de severidad. Con respecto a los subíndices indican el grado de severidad al cual pertenecen.

Índices de diversidad de especies bacterianas.

En las (Figuras 3 y 4), se puede observar los índices de diversidad para las dos variedades de palma aceitera.

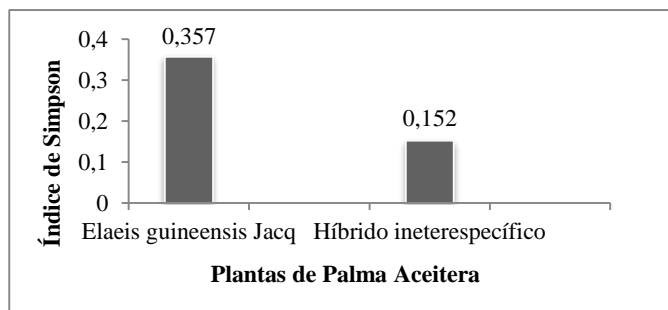


Fig.3. Índice de Simpsons en plantas de palma aceitera

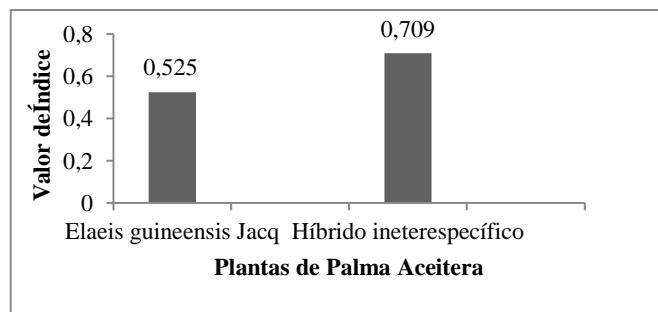


Figura.4. Índice de Shannon en plantas de palma aceitera

En la (Figura 5), se muestra el número de individuos de las diferentes especies bacterianas obtenidas en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

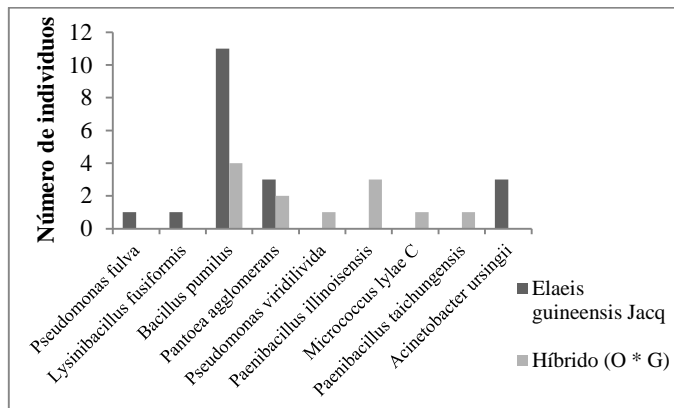


Fig.5. Número de Individuos por especie bacteriana, obtenidas en la dos variedades de palma aceitera.

Recuento bacteriano en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq. y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Se calculó el número de bacterias presentes en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*). Figuras 6 y 7 respectivamente.

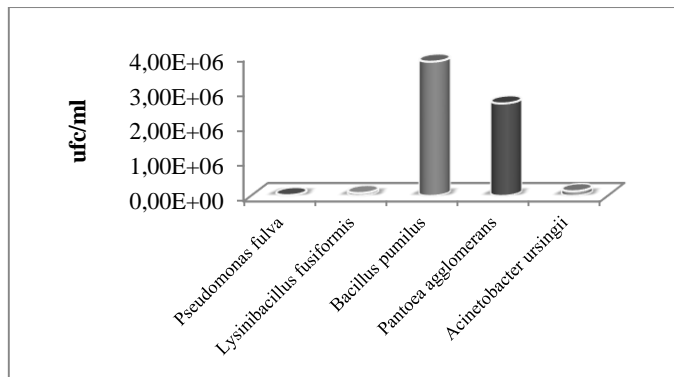


Fig.6. Recuento bacteriano en *Elaeis guineensis* Jacq

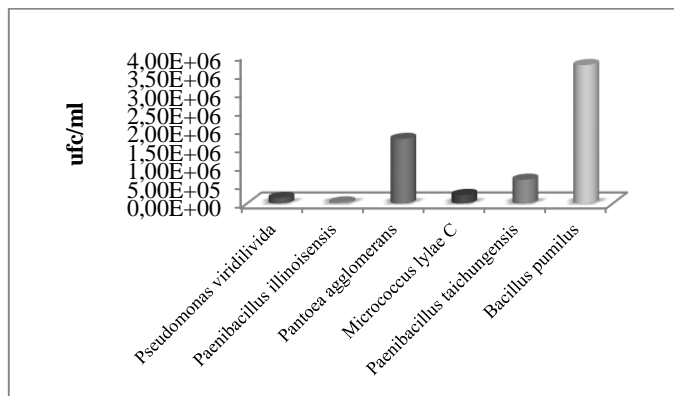


Fig.7. Recuento bacteriano en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Análisis de correspondencias simple.

Se utilizó el software estadístico InfoStat versión libre 2008, se escogió como variables, los tejidos de palma aceitera y las especies identificadas (Figuras 8 y 9).

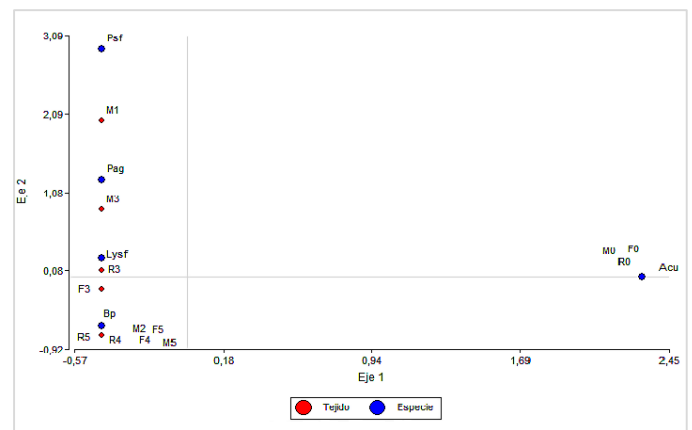


Fig8. Análisis de correspondencia simple para las variables; tejidos y especies bacterianas, identificadas en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq.

En el gráfico se observa que el primer eje (con una inercia de 13,64%), donde *Bacillus pumilus* (Bp) se encuentra presente en el meristema de grado 2 (M2), flecha y raíz de grado 4 (F4, M4), meristema, flecha, raíz de grado 5 (M5, F5, R5) y un poco distante de la flecha de grado 3 (F3). *Pseudomonas fulva* (Psf) y *Pantoea agglomerans* (Pag), están en meristema y raíz de grado 1 y grado 3 (M1, M3), por otro lado, *Lysinibacillus fusiformis* (Lysf) está cercano a la raíz de grado 3 (R3). *Acinetobacter ursingii* (Acu), está en el meristema, raíz, flecha de grado 0 (M0, R0, F0).

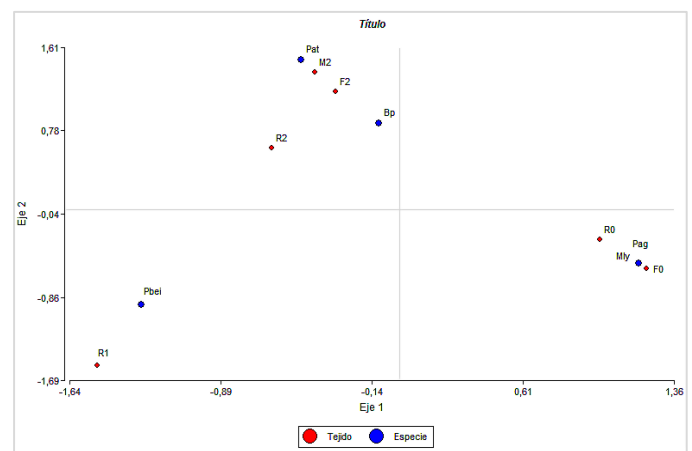


Fig.9. Análisis de correspondencia simple para las variables; tejidos y especies bacterianas identificadas en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Con una inercia del 25,94%, se puede apreciar que *Paenibacillus illinoisensis* (Pbei), está presente en la raíz de grado 1 (R1). *Paenibacillus taichungensis* (Pat) y *Bacillus pumilus* (Bp) se encuentran cercanos al meristemo, flecha de grado 2 (M2, F2,) y un poco alejados de la raíz de grado 2 (R2). *Pantoea agglomerans* (Pag) y *Micrococcus lylae C* (Mly) están en raíz y flecha de grado cero (R0, F0).

Fase 2: Identificación de hongos

Se realizó un análisis de Grupos con el software estadístico BioDiversity Pro versión 2, que permitió agrupar las colonias de hongos según el porcentaje de similitud de las pruebas morfológicas para (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Figura 10).

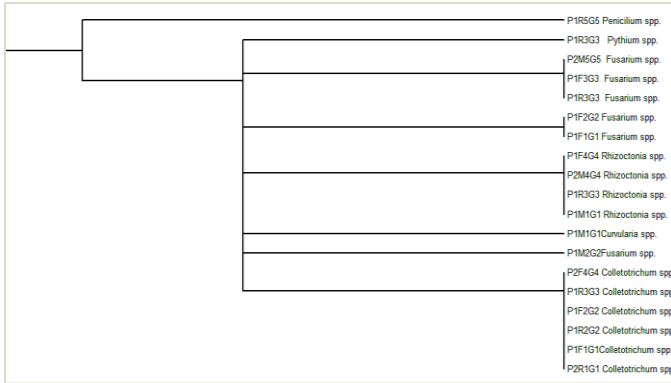


Fig.10. Dendrograma de similaridad, generado para hongos asociados a la pudrición de cogollo en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jac, utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.

Igual que en el caso anterior, se hizo un análisis de Grupos en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) (Figura 11).

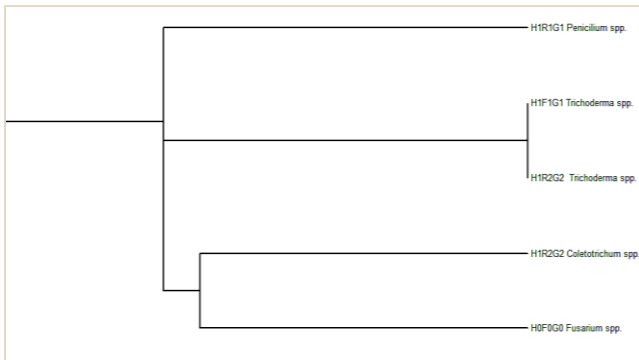


Fig.11. Dendrograma de similaridad, generado para hongos asociados a la pudrición de cogollo en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*), utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.

En la (Figura 12), se indica el número de individuos de las diferentes especies de hongos obtenidos en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*).

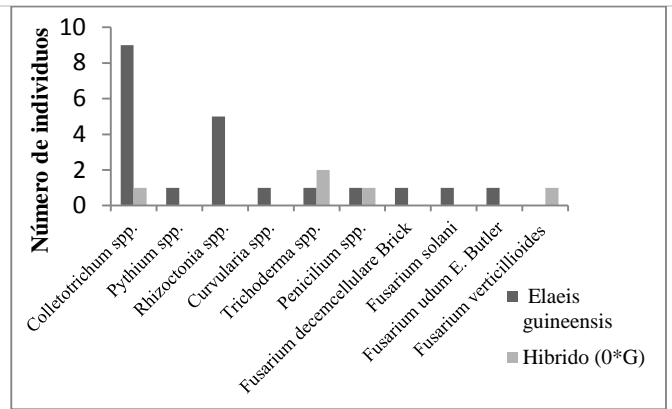


Fig.12. Fig.4. Número de Individuos por especie y género de hongos , obtenidos en la dos variedades de palma aceitera.

Recuento de Hongos en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq. y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*).

Se realizó un recuento de hongos cuyos resultados se observan en la (Figura 13) para el híbrido interespecífico y la (Figura 14) para *Elaeis guineensis* Jacq.

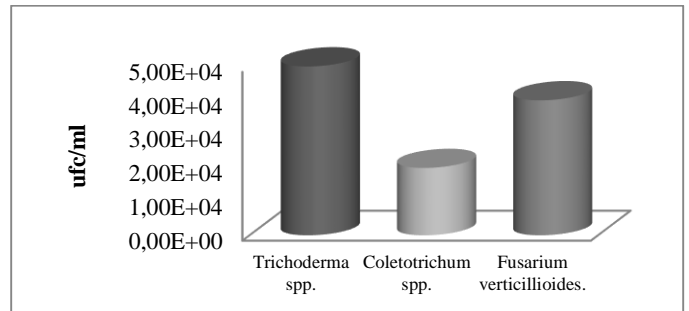


Fig.13. Recuento de hongos en en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*).

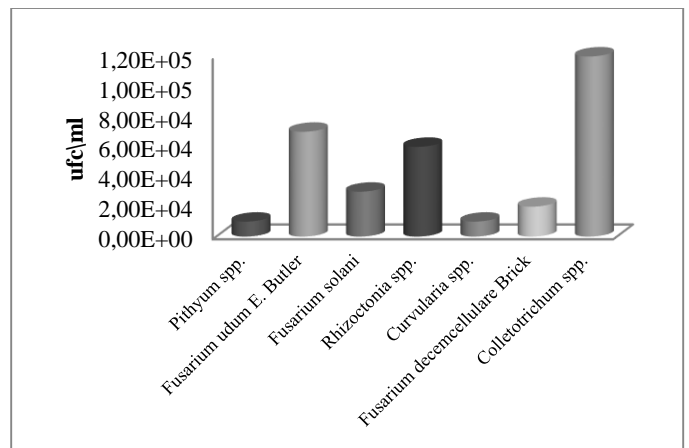


Fig.14. Recuento de hongos en *Elaeis guineensis* Jacq

Índices de diversidad de géneros y especies de hongos.

En las (Figuras 15 y 16), se puede observar los índices de diversidad para las dos variedades de palma aceitera.

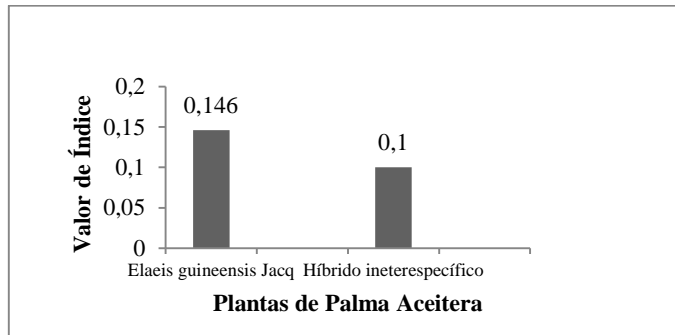


Fig.15. Índice de Simpson en plantas de palma aceitera

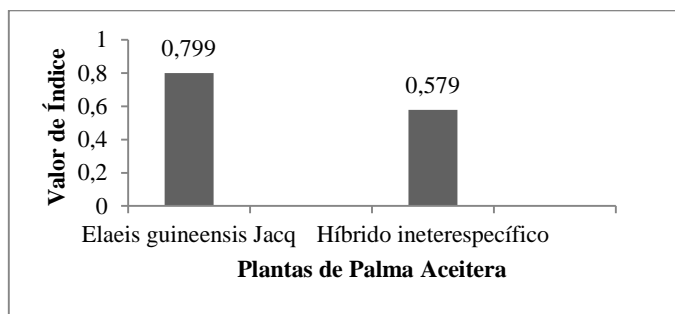


Fig.16. Índice de Shannon de las plantas de palma aceitera.

Análisis estadístico de correspondencias simple

De la misma forma que se hizo para bacterias, se realizó con el software InfoStat versión libre 2008 (Figuras 17 y 18).

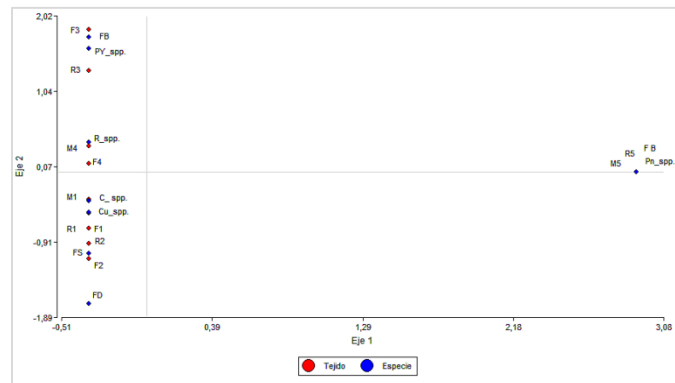


Fig.17. Análisis de correspondencia simple para las variables de tejidos y especies de hongos identificadas en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq.

El grafico sugiere, en su primer eje (con una inercia de 13.55%), que *Rhizoctonia* spp. (R_spp.), está en los tejidos del meristema de grado 4 (M4) y flecha grado (F4) y *Pythium* spp. (PY), están en la flecha de grado 3 (F3) y raíz de grado 3 (R3). *Colletotrichum* spp. (C_spp.), *Curvularia* spp, *Fusarium solani* (FS) y *Fusarium decemcellulare* Brick (FD), están en la raíz de grado 2 (R2), flecha de grado 2 (F2), flecha de grado 1

(F1), raíz de grado 1 (R1). *Penicilium* spp. (Pn_spp.) y *Fusarium udum* E. Butler (FB), están en el meristema, raíz de grado cinco (M5).

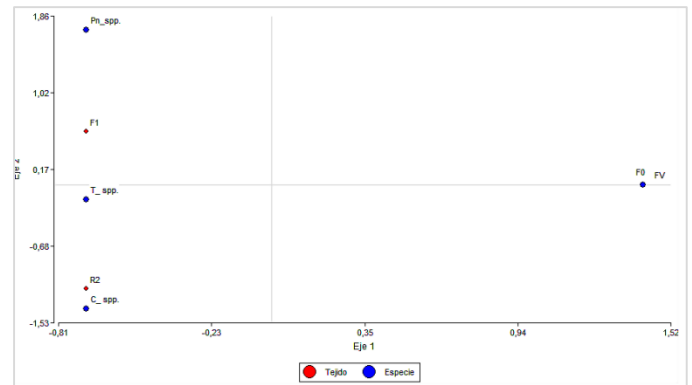


Fig.18. Análisis estadístico de correspondencia simple para las variables tejidos de palma aceitera y las especies de hongos identificadas en el híbrido interespecifico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*).

En el grafico se visualizan, en su primer eje (con una inercia de 37.50%), que *Colletotrichum* spp. (C_spp.) y *Trichoderma* spp., está presente en la raíz grado 2 (R2). *Penicilium* spp. (Pn_spp.), está en flecha grado 1 (F1). *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell se encuentra en flecha grado 0 (F0).

Caracterización morfométrica de *Fusarium* spp., en palma aceitera.

Se realizaron pruebas morfométricas, utilizando el microscopio Olympus BX43 y el programa cellSens 1.9 _en_02_krishna_16 August 2013, para comprobar cada una de las especies de *Fusarium* spp., identificadas con el sistema biológico (Figura 19).

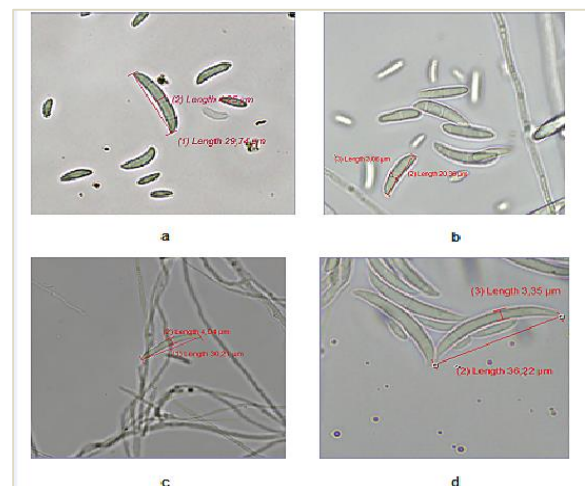


Fig.19. Morfometría en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq: a) *Fusarium decemcellulare* Brick, b) *Fusarium udum* E. Butler, c) *Fusarium solani*. En el híbrido interespecifico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*): d) *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell.

DISCUSIÓN

Bacterias asociadas a la pudrición de cogollo en palma aceitera.

En este estudio, se identificó a nivel de especie, un ejemplar de cada grupo determinado por software Biodiversity Pro con 100% de similaridad. Para *Elaeis guineensis* Jacq., se obtuvieron las siguientes especies: *Pseudomonas fulva*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Pantoea agglomerans*, *Acinetobacter ursingii*. El híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) presento, *Pseudomonas viridilivida*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Pantoea agglomerans*, *Micrococcus lylae* C, *Paenibacillus taichungensis*, *Bacillus pumilus*. Por lo tanto, de estas especies bacterianas, las más comunes en los dos tipos de palma aceitera son: *Bacillus pumilus*, con más unidades formadoras de colonias, seguido por *Pantoea agglomerans* (Figuras 5, 6 y 7).

Bacillus pumilus es Gram positivo, anaerobio facultativo, productor de catalasa. Las células vegetativas de *Bacillus* son de bordes rectos con extremos cuadrados o redondos, se pueden agrupar en cadena o encontrarse a solas. La ubicación de la espora puede ser en la zona central, terminal o subterminal, cuya forma puede ser redonda, cilíndrica u oval. Los *Bacillus* se caracterizan por ser móviles [13]. Esto concuerda, con todas las pruebas bioquímicas realizadas en las dos variedades de palma aceitera analizadas en este estudio. Este género, tiene una amplia distribución en diferentes tipos de ambiente como el suelo y los ecosistemas de agua dulce [14]. Debido a poseer varios mecanismos de supervivencia, ante condiciones físicas desfavorables, genera esporas, las cuales le permiten mantenerse viable confiriéndole una ventaja competitiva en el suelo [15]. Así mismo, presenta resistencia a cambios bruscos de temperatura debido a que cuenta con genes de shock térmico, que inducen proteínas chaperonas o proteasas, permitiéndole tener una capacidad metabólica exitosa para colonizar el ambiente rizosférico [16].

Entre las bacterias fitopatógenas productoras de enzimas, con la capacidad de macerar tejidos, se encuentran *B. pumilus*. Además, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, causan pudrición blanda en hortalizas. Por este motivo, se puede decir que este microorganismo está asociado a la pudrición de cogollo de palma aceitera, presentándose en los tres tipos de tejidos analizados [17]. Esto también, se puede observar en los análisis de correspondencia simple donde se observa, que *Bacillus Pumillus* es el microorganismo con mayor presencia en los diferentes tejidos analizados (Figuras 8 y 9).

Otras investigaciones en las cuales se ha identificado, a *B. pumilus* como un nuevo patógeno causante del tizón en hojas de mango (*Mangifera indica* L.) [18]. No obstante, resalta que las cepas de *B. pumilus* pueden infectar a varios cultivos, como la hoja del repollo, melocotón, manzana, pepino, calabaza, coliflor, ajo y cebolla.

Actualmente, se conoce que *Bacillus pumilus* es un patógeno emergente en diferentes cultivos, tales como, el cultivo de Ñame (*Dioscorea spp.*) como causante de la mancha foliar; en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) causante de los síntomas de mancha en las hojas [19]. Este microorganismo, recientemente es considerado como el agente causal en pudrición blanda de cogollo en *Agave de Tequila* en México. Al realizar inoculaciones por herida, en plantas sanas de agave en invernadero, se observó una pudrición blanda en todo el cogollo, desde el sitio de la inoculación hasta la punta del cogollo, transformándose en una pudrición de característica papelosa [20].

Se identificó también, *Pantoea agglomerans*, sinónimo de *Erwnia herbicola*, que es considerada como fitopatógena, debido a que existen estudios, donde se ha determinado como una bacteria asociada a la formación de síntomas iniciales, de pudrición de las inflorescencias y del cogollo, seguido de un secado y muerte repentina de palmas de coco (*Cocos nucifera* L) (Aguilar et al., 2013).

Se reporta que *Pantoea agglomerans* está asociada a la pudrición de cogollo en *Agave tequila* L, causando lesiones necróticas y acuosas en las hojas, que generalmente inician en la espina apical o en las espinas laterales, avanzando hacia el centro de la hoja y del cogollo, causando una pudrición descendente que llega hasta la piña y puede provocar la muerte de la planta [21]. Además, se la ha determinado como causante de clorosis y necrosis de las zonas foliares de palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* K) [22]. Debido a estos criterios, se le puede considerar en esta investigación, como un posible agente asociado a la pudrición de cogollo en palma aceitera.

En este estudio, aunque no estaba contemplado dentro de los objetivos, realizar pruebas de patogenicidad para profundizar los resultados obtenidos. Se hizo infectando tejidos de cebolla perla (*Allium cepa* L), mediante la técnica de inoculación por heridas, los mismos que fueron colocados en cámara húmeda por un tiempo de ocho días. Se observó que los tejidos infectados con *Bacillus pumilus*, *Pantoea agglomerans*, *Lysinibacillus fusiformis*, presentaron pudrición de color café oscuro con olor desagradable. Esto podría ser debido a la generación de enzimas pectinolíticas, propias de las bacterias fitopatógenas, característica que no se encuentra limitada a estos patógenos en particular [23].

Las bacterias, *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas viridilivida*, *Acinetobacter ursingii*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Micrococcus lylae* C, *Paenibacillus taichungensis*, no presentaron síntomas, lo cual concuerda con las características del blanco que eran trozos de cebolla perla inoculadas con agua destilada estéril.

Por otro lado, el índice de diversidad de Shannon del híbrido interespecífico (0,709) es mayor al de palma aceitera *Elaeis guineensis* Jac (0,525). Esto quiere decir, que en esta investigación, el híbrido presenta mayor diversidad y equitabilidad de especies, debido a que la mayoría están igualmente presentes, por lo tanto el grado de incertidumbre es

alto, puesto que existe la misma probabilidad de escoger cualquiera de las especies encontradas.

Según datos bibliográficos, el índice de diversidad de *Shannon* mide el grado de incertidumbre, que permite predecir a que especie pertenece un individuo escogido al azar de una colección. La diversidad y equitabilidad máxima se alcanza cuando todas las especies están igualmente presentes (Pla, 2006).

El índice de Simpson, se refiere a que la probabilidad de extraer dos individuos de la misma especie es alta, por eso se lo emplea como un índice de dominancia, debido a su marcada dependencia de las especies más abundantes [24]. Esto concuerda con los datos obtenidos (Figuras 3 y 4), donde se observa que la probabilidad de tomar dos individuos al azar y que ambos sean de la misma especie es mayor en *Elaeis guineensis* Jac (0,357) que en el híbrido interespecífico (0,152).

Además, para la conservación se liofilizo cada una de las especies de hongos identificadas, que fueron conservadas en caldo nutritivo y glicerol al 20%, posteriormente se hizo 6 repeticiones en tubos eppendorf y se las coloco [12].

Hongos asociados a la pudrición de cogollo en palma aceitera.

Los géneros de hongos aislados, en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq fueron: *Phytium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Curvularia* spp., *Colletotrichum* spp. y del híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. Se identificó a nivel de especie el género *Fusarium* spp., debido a que este presenta problemas de mayor importancia fitosanitaria, en un amplio espectro de tejidos vegetales. También, por la falta de reactivos y porque algunos géneros de hongos no se encuentran en la base de datos del equipo.

En palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq., se identificaron las siguientes especies: *Fusarium decemcellulare* Brick, *Fusarium solani* y *Fusarium udum* E. Butler y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), se identificó *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell. Estas especies de hongos son fitopatogenas, debido a que en otros estudios, se los ha identificado como agentes causales de enfermedades de importancia fitosanitaria, por esta razón, se los puede considerar como agentes relacionados a la pudrición de cogollo. A continuación, se menciona cada una de ellos.

En estudios realizados con pudrición de flechas, cogollo y amarillamiento de hojas, que son síntomas característicos del complejo pudrición de cogollo (PC), se han identificado hongos como *Fusarium solani*, con el cual se han realizado pruebas de patogenicidad sin poder reproducir los síntomas característicos de la enfermedad [25]. En esta investigación, se obtuvo este hongo, que a pesar de no ser un agente causal de esta enfermedad, no debe descartarse como un

microorganismo asociado a la pudrición de cogollo en palma aceitera.

Fusarium decemcellulare Brick, es causante de la enfermedad conocida como la escoba de bruja en mango (*Mangifera indica* L.), cuyos síntomas se caracterizan por una excesiva proliferación de yemas que salen del ápice o de las axilas foliares, con entrenudos reducidos, agrupadas formando una estructura compacta denominada escoba de bruja [26]. Por otro parte, *Fusarium udum* E. Butler ha sido reportado, como causante del marchitamiento de las raíces de guisantes, identificado en la india (Joshi, 2001). *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell, que a pesar de no ser un hongo cuarentenario, es causante de daños importantes en semillas y plántulas de pino cultivadas en viveros forestales. También es uno de los causantes de la pudrición en banano [27]. Estos hongos no se han identificado a nivel de especie en palma aceitera, sin embargo son de importancia fitosanitaria para otro tipo de plantas como se menciona anteriormente.

En este estudio se aislaron también, cepas de *Colletotrichum* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., en las dos variedades de palma aceitera, los cuales causan pudrición tejido vegetal, provocando la muerte de las plantas (Moorman, 2012). En este caso no se identificó a nivel de especie, debido a que estos géneros no constan en la base de datos del sistema Biolog. Por otra parte, se aisló *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp., que son considerados como hongos saprofitos, es decir no son causantes de enfermedades [28].

De las especies mencionadas anteriormente (Figura 13), el género que presento más unidades formadoras de colonias fue *Colletotrichum* spp., seguido por *Fusarium udum* E. Butler, en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y para el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), el hongo con más unidades formadoras de colonias (Figura 14), fue *Trichoderma* spp., seguido por *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell. Por otra parte, el análisis de correspondencia simple muestra, que la distribución de géneros y especies de hongos encontrados en los tejidos analizados son totalmente diferentes en las dos variedades de palma aceitera (Figuras 17 y 18).

El índice de *Shannon* (0,799) en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq es mayor al índice *Shannon* (0,579) del híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) (Figura 16). Esto quiere decir, que existe mayor diversidad en la primera variedad de palma aceitera, por otro lado la equitabilidad de *Shannon* (*J'*) del híbrido (0,961) es mayor a la de *Elaeis guineensis* Jacq (0,885), entendiéndose que en el híbrido existe una distribución más uniforme de las especies. Esto concuerda con la bibliografía, la cual menciona que la equitabilidad (*E*) es, cuan uniforme están distribuidos los individuos entre las especies. Permitiendo, reflejar la distribución de individuos entre especies [29].

El índice de *Simpson*, toma en cuenta la dominancia de las especies con mayor representatividad, facilitando medir la riqueza de los organismos. A medida que este índice se

incrementa, la diversidad decrece [30]. Esto concuerda con los datos obtenidos en la (Figura 15), donde se observa que el índice de Shannon es mayor al índice de Simpson.

Para comprobar las especies de *Fusarium* spp., identificadas con el sistema Biolog, se realizó medidas morfométricas para cada uno de ellas (Figura 19), análisis que no estaba contemplado en los objetivos.

Las medidas obtenidas de las macroconidias, para cada una de las especies son las siguientes: *Fusarium decemcellulare* Brick (29,74 x 4,25) µm, *Fusarium udum* E. Butler (20,36 x 3,06) µm, *Fusarium solani* (30,21 x 4,04) µm, *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell (36,22 x 3,35) µm. Estas medidas de las macroconidias concuerdan con la bibliografía, la cual menciona que para *Fusarium decemcellulare* Brick (27-77 x 3-5) µm, *Fusarium udum* E. Butler (13,03-20,6 x 2,1-3,6) µm, *Fusarium solani* (28-65 x 4-6) µm, *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell (31-58 x 2,7-3,6) µm [31].

En la conservación se liofilizo cada una de las especies de hongos identificadas, con sucrosa al 10%, peptona al 20% y papel filtro, realizando 6 repeticiones por cada tipo de cepa [12].

CONCLUSIONES

Se determinó, que *Bacillus pumilus* (3832000 ufc/ml) y *Pantoea agglomerans* (2640000 ufc/ml) en *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), *Bacillus pumilus* (3730000 ufc/ml) y *Pantoea agglomerans* (1740000 ufc/ml), es decir son las especies bacterianas con mayor cantidad de unidades formadoras de colonias, en las dos variedades de palma aceitera.

El índice de Shannon en bacterias (0,525) en (*Elaeis guineensis* Jacq.) es menor al índice de Shannon de bacterias (0,709) en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), por lo tanto la diversidad es mayor en la segunda variedad de palma aceitera.

El recuento de hongos realizado en (*Elaeis guineensis* Jacq.), presenta a *Colletotrichum* spp., (120000 ufc/ml), luego están *Fusarium udum* E. Butler. (70000 ufc/ml) y *Rhizoctonia* spp. (60000 ufc/ml), mientras que en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), *Trichoderma* spp., es el hongo que tiene (50000 ufc/ml), seguido por *Fusarium verticillioides* con (40000 ufc/ml).

Se observó, que el índice de Shannon en hongos (0,799) en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) es mayor a la biodiversidad (0,579), en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), entendiéndose que la primera variedad de planta, tiene un grado de incertidumbre superior a la segunda variedad de palma aceitera.

Bacillus pumilus, es la especie bacteriana que más incidencia tiene en los tres tipos de tejidos analizados en las dos variedades de palma aceitera.

Los hongos identificados, están presentes en todos los tejidos y grados de severidad, muestreados en las plantas de palma aceitera.

El aporte de este estudio, es la identificación de dos especies de hongos (*Fusarium udum* E. Butler y *Fusarium verticillioides*) y en bacterias *Bacillus pumilus*, los cuales han sido reportados en otros estudios a nivel de género, más no de posibles especies.

La identificación, de hongos y bacterias a nivel de especie, mediante el sistema biolog, es importante debido a que permite determinar la especie del microorganismo en menor tiempo, por pruebas bioquímicas contenidas en su base de datos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Rodrigo Avalos docente de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, al Ing. Pablo Gallardo (Director de Palmera de los Andes San Lorenzo), al Ing. Marco Martínez (Técnico de Polinización de Palmera de los Andes San Lorenzo), al Ing. Geovanny Pico (Técnico de Fitopatología de Palmera de los Andes San Lorenzo) quienes me ayudaron a realizar este proyecto, también agradezco a la Dra. Verónica Ramírez y Martín Marcial (Encargados del laboratorio de fitopatología en Agrocalidad) por permitirme realizar los análisis necesarios.

REFERENCIAS

- [1] Loor, J. (2008). Estudio de la combinación de fertilizantes químicos en vivero de palma aceitera (*Elaeis Oleífera* x *Elaeis Guineensis*) para optimizar el desarrollo en palmeras del Ecuador- Cantón Shushufindi. Disponible: http://www.agrytec.com/agricola/images/stories/auspiciante_secundario/agrociencias/tesis_palma.pdf
- [2] Tovar, M. J. P. 2006. Historia e importancia de la pudrición del cogollo de la palma de aceite. Curso taller Manejo de la pudrición de cogollo (PC) en la zona occidental. Tumaco, Colombia.
- [3] Mariau D., 1992. Embrapa – Cirad/Irho. Mission entomologique, 24 septembre-3octobre 1991. Document Irho 2413, mars 1992, 31 p.+ annexes.
- [4] Duarte, S. (2007). Pruebas de Patogenicidad *in vitro* con microorganismos aislados de palmas afectadas por marchitez letal Disponible: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis96.pdf>
- [5] Ehandi. (1967, 06). Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. books.google.com.ec/books?id=ch0PAQAIAAJ
- [6] French & Hebert. (1980, 08). Métodos de Investigación Fitopatológica.(IICA). http://books.google.com.ec/books/about/M%C3%A9todos_de_investigaci%C3%B3n_fitopatol%C3%B3gica.html?id=nR8PAQAIAAJ&redir_esc=y

- [7] Suslow, T. S. (1982). Application of a rapid meth for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917-918
- [8] Barnett, I. L. & Hunter, B. B. 1987. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Fourth edition. New York: MacMillan Publishing Company. p. 198
- [9] Rojas, A. (2011). Conceptos y práctica de microbiología general. Disponible: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>
- [10] BIOLOG, 2011. Microbial Identification. Disponible: http://www.iul-inst.com/nueva/images/biolog_mi_brochure.pdf
- [11] BIOLOG, 2007. Micro Station™ System MicroLog Version 4.2. Disponible: http://wiki.bio.dtu.dk/teaching/images/8/82/MicroStation_System_Version_4.2_User_Guide.pdf
- [12] Waites, M.J.; Morgan, N.L.; Rockey, J.S. & Higton G. (2001). *Industrial Microbiology, an Introduction*. Blackwell Science. 288pp.
- [13] Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. 1994. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- [14] Mandal, M. 2005. Plasmid-Mediated dimethoate degradation by *Bacillus licheniformis* isolated from a fresh water fish labeo rohita. *J. Biomed. Biotechnol.* Vol. 3. 280p.
- [15] Stephens C. 1998. Bacterial sporulation: A question of commitment? *Current Biology*. 8: 45-48.
- [16] Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J., Lker, U. and Hecker, M. 2001. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis* *Journal of Bacteriology* 183: 5617–5631.
- [17] Chiu, W.F., Di, Y. P., Choue, Y. Y. and Sie, F. J. 1964. Some bacteria causing decay of Chinese cabbage in storage. *Acta Phytopathol.* 7:127-134.
- [18] Galal, A. 2006. *Bacillus pumilus* a new pathogen on mango plants. *Plant Pathol. Dept. Fac. Agric. Minia Univ. Minia-Egypt*. 34:17-29.
- [19] Font, M. I., Bassimba, D. D. M., Cebrian, M.C., Molina, L. M. and Jorda, C. 2010. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain. *Plant Pathology* 59: 400.
- [20] Cen J, 2012. Determinación del agente causal de la pudrición del cogollo del *Agave Tequilana* weber var. Azul en el estado de Jalisco. Disponible: http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/1747/Cen_Caamal_JC_MC_Fitopatologia_2012.pdf?sequence=1
- [21] Jimenez H, G. Virgen C., O. Martinez, G. Valdemark and V. Olalde P. 2004. *European Journal of Plant Pathology*, Issue Volume 110. Number 3 pp. 317-331.
- [22] Sánchez et al., (2003). *Pantoea agglomerans* y *Sphingomonas paucimobilis* en la bacteriosis del palmito de peñibaye (*Bactris gasipaes* K): un estudio ultraestructural. Disponible: http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a01-8385_memoria.pdf
- [23] Cuppels, D., Kelman, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 64: 468–475. de 2013 de: http://www.iul-inst.com/nueva/images/biolog_mi_brochure.pdf
- [24] Vargas, J. (2009). Metodología para calcular el índice de diversidad acuática/biológica. caso de estudio. Disponible: http://www.udc.es/dep/bave/jfreire/pdf_conservacion/2_Biodiversidad%20%281%29.pdf
- [25] Vargas, M. (1992). *Fusarium Solani*. Agente causal del complejo pudrición del cogollo? Disponible: publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/viewFile/.../375
- [26] Pérez et al., (2012). First report in cuba of green point gall of cocoa cushion caused by *albonectria rigidiuscula* (*fusarium decemcellulare*). Disponible: <http://www.inisav.cu/fitosanidad/2012/16%281%2912.pdf>
- [27] Zeng et al., (2013). The *Fusarium* species isolated from banana and their phylogenetic relationships. Disponible: <http://www.inisav.cu/fitosanidad/2012/16%281%2912.pdf>
- [28] Domsch, K. H., Gams, W. y Anderson, T. (2007) *Compendium of Soil Fungi*, 2nd edition, IHW Verlag, Eching.
- [29] Newman, M.C. Y M. A. Unger. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Estados Unidos. 458 pp. Referenciada 10/5/2009. Disponible: <http://foros.monografias.com/archive/index.php/t-38141.html>
- [30] Pielou E.C. 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology*. Wiley Interscience. New York, EE.UU. 98 pp. Referenciada. 04/042009. Disponible: <http://rev-inv-ope.univ-paris1.fr/files/26205/IO-26205-9.pdf>
- [31] Monzón, A., & Rodríguez, L. (2001). Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Disponible: <http://www.siemc.org>