



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: EDISON OSWALDO VEGA HIDALGO

**TEMA: IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS Y
BACTERIAS AISLADOS EN LA PUDRICIÓN DE COGOLLO EN
PALMA DE ACEITE (*Elaeis guineensis* Jacq.) Y EN EL
HÍBRIDO INTERESPECÍFICO (*Elaeis oleífera* x *Elaeis
guineensis*) EN PALMERAS DE LOS ANDES SAN LORENZO.**

DIRECTOR: ING. MARCO TAIPE

CODIRECTOR: ING. JÉSSICA DUCHICELA, Ph.D.

SANGOLQUÍ, OCTUBRE DEL 2014

CERTIFICACIÓN

Ing. Marco Taipe

Ing. Jéssica Duchicela, Ph.D.

Certifican:

Que el trabajo titulado, IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS Y BACTERIAS AISLADOS EN LA PUDRICIÓN DE COGOLLO EN PALMA DE ACEITE (*Elaeis guineensis* Jacq.) Y EN EL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO (*Elaeis oleífera x Elaeis guineensis*) EN PALMERAS DE LOS ANDES SAN LORENZO, realizado por EDISON OSWALDO VEGA HIDALGO, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Debido a que el presente trabajo es parte de las investigaciones realizadas por los laboratorios de Fitopatología de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad (AGROCALIDAD), la empresa productora de aceite (PALMERAS DE LOS ANDES SAN LORENZO) y la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, se deja en libertad del autor, de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad (AGROCALIDAD), la empresa productora de aceite (PALMERAS DE LOS ANDES SAN LORENZO) y la Carrera de Ingeniería en Biotecnología para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a EDISON OSWALDO VEGA HIDALGO que lo entregue a ING. MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ, en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, 17 de octubre de 2014

Ing. Marco Taipe

DIRECTOR

Ing. Jéssica Duchicela, Ph.D.

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Edison Oswaldo Vega Hidalgo

Declaro que:

El proyecto de grado denominado IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS Y BACTERIAS AISLADOS EN LA PUDRICIÓN DE COGOLLO EN PALMA DE ACEITE (*Elaeis guineensis* Jacq.) Y EN EL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) EN PALMERAS DE LOS ANDES SAN LORENZO, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 17 de octubre de 2014

Edison Oswaldo Vega Hidalgo

AUTORIZACIÓN

Yo, Edison Oswaldo Vega Hidalgo

Autorizo a la Universidad De Las Fuerzas Armadas ESPE, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS Y BACTERIAS AISLADOS EN LA PUDRICIÓN DE COGOLLO EN PALMA DE ACEITE (*Elaeis guineensis* Jacq.) Y EN EL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) EN PALMERAS DE LOS ANDES SAN LORENZO, realizado por EDISON OSWALDO VEGA HIDALGO, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 17 de octubre de 2014

Edison Oswaldo Vega Hidalgo

DEDICATORIA

Esta investigación dedico a Marcos Guerrero, por enseñarme que no se debe perder tiempo, en darle sentido a la vida, sencillamente hay que vivirla y divertirse al máximo. A mi abuelo Celio Enrique por enseñarme que “Para amar y respetar a las demás primero debo amarme y respetarme a mí mismo”. A mis queridos padres Oswaldo y Yolanda quienes alguna vez me dijeron que un “Ser humano solo fracasa cuando deja de esforzarse”, y a mis dos hermanos Mauricio y Paúl porque en ellos encuentro un cariño especial, el cual me permite relajarme y olvidar todos mis problemas.

Edison Oswaldo Vega Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

Gracias DIOS, por demostrarme a mí mismo que con voluntad, soy capaz de realizar las cosas que me proponga en la vida y ver en mi familia la luz que uno necesita como incentivo para continuar.

Agradezco a Marco Taipe, Jessica Duchicela y Rodrigo Avalos docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología por verme no como un estudiante sino como un amigo, al Ing. Pablo Gallardo (Director de Palmeras de los Andes San Lorenzo), al Ing. Marco Martínez (Técnico de Polinización de Palmeras de los Andes San Lorenzo), al Ing. Geovanny Pico (Técnico de Fitopatología de Palmeras de los Andes San Lorenzo) quienes me ayudaron a realizar este proyecto, también agradezco a la Dra. Verónica Ramírez (Directora del Laboratorio de Fitopatología en Agrocalidad) y Martin Marcial (Encargado del Laboratorio de Fitopatología en Agrocalidad) por permitirme realizar los análisis necesarios para este tema de tesis.

A mis amigos especialmente a Esteban Sánchez, Alexander Toaza, por su amistad y apoyo incondicional.

GRACIAS.

Edison Oswaldo Vega Hidalgo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTADO DE TABLAS.....	x
LISTADO DE FIGURAS.....	xi
LISTADO DE ANEXOS.....	xii
NOMENCLATURA.....	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	
1.1 Formulación del problema:.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	2
1.3.1 Objetivo General	2
1.3.2 Objetivos Específicos.....	2
1.4 Marco Teórico:.....	3
1.4.1 Generalidades.....	3
1.4.2 Taxonomía	4
1.4.3 Morfología	4
1.4.4 Descripción botánica y sintomatología.....	5

1.4.5 Híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>).....	6
1.4.6 Microorganismos asociados a la pudrición de cogollo	8
1.4.7 Propiedades físicas del suelo que permiten el desarrollo de la PC. ...	10
1.4.8 Pudrición de cogollo en plantas de vivero.....	10
1.4.9 Escala de Severidad	11
1.4.10 Índices de diversidad	13

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes.	16
2.2 Zona de Estudio.....	16
2.3 Periodo de Tiempo de investigación.....	17
2.4 Diseño estadístico.....	17
2.5 Procedimiento	17
2.5.1 Muestreo.....	17
2.5.2 Procesamiento de las muestras.....	19
2.5.3 Identificación de hongos y bacterias mediante el sistema Biolog	23
2.5.4 Conservación de bacterias.....	24
2.5.5 Preparación de microcultivos	25

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Fase 1: Identificación Bacteriana	27
3.1.1 Caracterización morfológica e identificación de especies bacterianas en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.....	27
3.1.2 Caracterización morfológica e identificación de especies bacterianas en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>).....	30
3.1.3 Índices de diversidad para la identificación de especies bacterianas	32
3.1.4 Recuento Bacteriano en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. y en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>).....	35
3.1.5 Análisis de correspondencias simple.	37

3.2 Fase 2: Identificación de hongos	38
3.2.1 Caracterización morfológica e identificación de hongos en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.....	39
3.2.2 Caracterización morfológica e identificación de hongos en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera x Elaeis guineensis</i>).	41
3.2.3 Recuento de Hongos en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. y en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera x Elaeis guineensis</i>).....	45
3.2.4 Análisis estadístico de correspondencias simple para hongos.	46
3.2.5 Caracterización morfométrica de <i>Fusarium</i> spp., en palma aceitera	48
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.	50
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.	58
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.	60
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.	61

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Índices de calidad de aceites. tomado de: (Bastidas et al, 2005) .	6
Tabla 2 Resumen de la historia de los principales estudios fitopatológicos acerca de la pudrición de cogollo en <i>Elaeis guineensis</i> y microorganismos asociados aunque sin pruebas para satisfacer los postulados de koch. Tomado de: (Laing D, 2010).	9
Tabla 3 Pruebas bioquímicas realizadas a cada una de las cepas bacterianas de <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	28
Tabla 4 Pruebas bioquímicas realizadas a cada una de las cepas bacterianas del híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>).	30
Tabla 5 Identificación de especies bacterianas en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq y en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>), mediante la utilización del sistema de identificación biolog.	32
Tabla 6 Estadística descriptiva de los índices de diversidad para las dos variedades de palma aceitera.	34
Tabla 7 Índices de diversidad bacteriana obtenidos en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq y en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>).	35
Tabla 8 Hongos aislados de palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	39
Tabla 10 Estadística descriptiva para la identificación de hongos de los índices de diversidad para las dos variedades de palma aceitera.	44
Tabla 11 Índices de diversidad para hongos obtenidos en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq y en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>).	45

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Descripción botánica (Martínez et al., 2009).....	5
Figura 2. Escala de severidad de la pudrición de cogollo Fuente: (González N, 2010).....	12
Figura 3. Muestreo de palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq y el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>).	18
Figura 4. Equipo de muestreo utilizado y quema del material contaminado.	18
Figura 5. Preparación y aislamiento de las muestras	19
Figura 6. Pruebas bioquímicas para bacterias.....	22
Figura 7. Purificación de hongos.....	23
Figura 8. Equipo de identificación Biolog	24
Figura 9. a) <i>Fusarium udum</i> E. Butler, b) <i>Fusarium solani</i> , c) <i>Fusarium decemcellulare</i> , d) <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell.	25
Figura 10. Dendograma de similaridad, generado para bacterias asociadas a la pudrición de cogollo en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jac, utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.....	29
Figura 11. Dendograma de similaridad, generado para bacterias asociadas a la pudrición de cogollo en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>), utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.	31
Figura 12. Índice de Simpsons en plantas de palma aceitera.....	33
Figura 13. Índice de Shannon en plantas de palma aceitera	33
Figura 14. Especies bacterianas obtenidas en las dos variedades de palma aceitera.	34
Figura 15. Recuento bacteriano en <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	36
Figura 16. Recuento bacteriano en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera</i> x <i>Elaeis guineensis</i>).	36

Figura 17. Análisis de correspondencia simple para las variables; tejidos y especies bacterianas, identificadas en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	37
Figura 18. Análisis de correspondencia simple para las variables; tejidos y especies bacterianas identificadas en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera x Elaeis guineensis</i>).	38
Figura 19. Dendograma de similaridad, generado para hongos asociados a la pudrición de cogollo en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jac, utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.	41
Figura 20. Dendograma de similaridad, generado para hongos asociados a la pudrición de cogollo en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera x Elaeis guineensis</i>), utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.	42
Figura 21. Índice de Simpson en plantas de palma aceitera	43
Figura 22. Índice de Shannon de las plantas de palma aceitera.....	43
Figura 24. Recuento de hongos en en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera x Elaeis guineensis</i>).	45
Figura 25. Recuento de hongos en <i>Elaeis guineensis</i> Jacq	46
Figura 26. Análisis de correspondencia simple para las variables de tejidos y especies de hongos identificadas en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	47
Figura 27. Análisis estadístico de correspondencia simple para las variables tejidos de palma aceitera y las especies de hongos identificadas en el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera x Elaeis guineensis</i>).	48
Figura 28. Morfometría en palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> Jacq: a) <i>Fusarium decemcellulare</i> Brick, b) <i>Fusarium udum</i> E. Butler, c) <i>Fusarium solani</i> . En el híbrido interespecífico (<i>Elaeis oleífera x Elaeis guineensis</i>): d) <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell.	49

NOMENCLATURA

PC: Pudrición de Cogollo.

HIBRIDO (O x G): Hibrido Interespecífico (*Elaeis oleífera* X *Elaeis guineensis*).

GEN III: Placa de sistema BIOLOG para bacterias.

FF: Placa sistema BIOLOG para hongos.

YDC: Agar, dextrosa, carbonato de calcio, extracto de levadura.

BK: Medio de Cultivo para *Pseudomonas spp.*

AN: Agar nutritivo.

BUG: Medio de cultivo enriquecido para cultivo de bacterias en sistema BIOLOG.

PDAac: Agar papa dextrosa con ácido láctico y cloranfenicol.

SNA: Agar de Nutrientes sintéticos.

MEA: Extracto de Malta.

IFA: Caldo para suspensión de bacterias en sistema BIOLOG.

FF: Caldo para suspensión de hongos en sistema BIOLOG.

"H": Índice de Shannon.

"λ": Índice de Simpson.

J': Índice de Equitabilidad de Shannon

1/D: Índice recíproco de Simpson.

AC: Análisis de Correspondencia.

UTM: Sistema de coordenadas universal transversal de Mercator.

RESUMEN

La pudrición de cogollo afecta a la palma de aceite, ocasionando considerables pérdidas económicas en la producción. Hasta el momento no se han identificado los agentes causales de esta enfermedad. 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 palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), afectadas con pudrición de cogollo. Se muestreó dos plantas enfermas por cada grado de severidad y dos sin síntomas. Bacterias y hongos, se aislaron y evaluaron 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, la estimación de la biodiversidad y abundancia de cada una de las especies encontradas, fueron evaluadas utilizando el programa estadístico BioDiversity Pro versión 2. De las especies bacterianas obtenidas, *Bacillus pumilus* y *Pantoea agglomerans*, tienen mayor cantidad en las dos variedades de palma aceitera. Así mismo, los hongos fitopatogenos de mayor importancia fitopatológica que se obtuvo son: *Colletotrichum* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium decemcellulare* Brick, *Fusarium solani*, *Fusarium udum* E. Butler. en (*Elaeis guineensis* Jacq.) y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), fueron *Colletotrichum* spp. y *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell.

PALABRAS CLAVES: BIODIVERSIDAD, SISTEMA BIOLOG, DENDOGRAMAS, PALMA DE ACEITE, PUDRICIÓN DE COGOLLO.

ABSTRACT

Bud rot affects oil palm, causing substantial economic losses in production. So far the causative agents of this disease have not been identified. The research was conducted at Palmeras de los Andes San Lorenzo, in the areas of Najurungo and Chanul 2, in order to identify, assess and compare the amount and diversity of phytopathogenic bacteria and fungi present in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and in the interspecific hybrid (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) affected by bud rot. Two sick plants for each degree of severity and two asymptomatic plants were sampled. Bacteria and fungi were isolated and assessed by morphological criteria, then they were grouped in dendrograms using the Bray-Curtis similarity measure. Subsequently, the species identification of bacteria and fungi was carried out by the Biolog identification system. The amount, diversity estimation and abundance of each species that was found were evaluated using the statistical program Biodiversity Pro 2.0. Among the bacterial species that were obtained, *Bacillus pumilus* and *Pantoea agglomerans* have the greater amount in the two oil palm varieties. Likewise, phytopathogenic fungi of the greatest phytopathological importance that were obtained were: *Colletotrichum* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium decemcellulare* Brick, *Fusarium solani*, *Fusarium udum* E. Butler. in (*Elaeis guineensis* Jacq.), and *Colletotrichum* spp. and *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell in the interspecific hybrid (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*).

KEYWORDS: BIODIVERSITY, BIOLOG SYSTEM, DENDROGRAMS, PALM OIL, BUD ROT.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.

1.1 Formulación del problema:

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 continuar con el control de esta enfermedad.

Debido a esta problemática actual, Palmeras de los Andes está dirigiendo su investigación a la obtención de un material híbrido (O x G), el cual presenta mejor calidad de aceite, crecimiento y tolerancia a enfermedades, sin embargo este se ha visto afectado por la pudrición de cogollo, por lo que se están realizando estudios para ver el progreso de la enfermedad en este nuevo cultivo.

Se conocen algunas características de esta enfermedad pero hasta el momento no se ha podido identificar sus agentes causales. Actualmente, no se han desarrollado métodos de detección sensibles y precisos que permitan identificar y controlar esta enfermedad. Solo continuando con las investigaciones se podrá desarrollar y validar estrategias de manejo que eviten su diseminación a otras regiones palmicultoras del país y disminuir las pérdidas económicas que esta representa (Tovar M, 2006).

El objetivo de este estudio es identificar bacterias y hongos fitopatógenos mediante técnicas morfológicas y bioquímicas.

1.2 Justificación del problema

En el país, la pudrición de cogollo se ha convertido en una de las principales limitaciones en cultivo de palma de aceite, ocasionando pérdidas en la producción de hasta un 30% en toneladas de fruto fresco (Santos A, 2010).

Debido a la diversidad de situaciones, tanto de la expresión de síntomas o el proceso de propagación no es posible hablar de la pudrición del cogollo en singular, sino que esta varía dependiendo del lugar donde se encuentre y como está siendo controlada (Franqueville H, 2001). Para contrarrestar esta enfermedad se debe identificar agentes asociados mediante diferentes herramientas ya sean bioquímicas o morfológicas, las cuales parten desde una simple inspección de los tejidos afectados.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Identificación morfológica de hongos y bacterias aislados en la pudrición de cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) en Palmeras de los Andes San Lorenzo con herramientas morfológicas y bioquímicas.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar bacterias y hongos fitopatógenos según el grado de severidad que presenten las palmas aceiteras (*Elaeis guineensis* Jacq.) y el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* 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*).

1.4 Marco Teórico:

1.4.1 Generalidades

El cultivo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) está atravesando un desarrollo sustancial en América Latina. De hecho, sólo había 60.000 hectáreas cosechadas en 1970, 100.000 hectáreas en 1980 y 245.000 hectáreas en 1990, con 135.000 y 96.000 hectáreas cosechadas respectivamente en el año 2000. Colombia y Ecuador reúnen más del 60% de plantaciones de palma aceitera de América Latina (INEN, 2011).

La enfermedad de pudrición del cogollo se puede presentar de varias formas: una forma letal que es predominante en la Amazonía ecuatoriana, brasileña y en ciertas zonas de Colombia y Surinam. Una forma no letal, con una alta tasa de recuperación que es principalmente encontrada en los Llanos colombianos. Hasta el momento, no se conoce si éstas son manifestaciones diferentes de la misma enfermedad, o se trata de fenómenos patológicos o fisiológicos distintos (Franqueville H, 2001).

En el 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 (INEN, 2011). Este crecimiento ha ido acompañado de la generación de fuentes de empleo directo para 90,000

personas e indirecto para 50,000 más, y genera 75,000 millones de dólares en exportaciones anuales. El 87.1% de los palmicultores son dueños de pequeñas áreas de cultivo con plantaciones menores a 50 hectáreas (Censo Palmero, 2005), lo que refleja el enorme impacto social del cultivo.

1.4.2 Taxonomía

La palabra “*Elaeis*” proviene del nombre griego *Eleia*= Olivo y por proceder de la palabra *Guinea*= Guineensis, que hace referencia a la característica de producir aceite (Uzunova-Donova, 2004-2005).

- División: Fanerógamas,
- Tipo: Angiosperma,
- Clave: Monocotiledónea,
- Orden: Palmales,
- Familia: Palmaceae,
- Tribu: Coccoinea
- Género: *Elaeis* (*guineensis* y *oleífera*).
- Especie: *guineensis*
- Nombre científico: *Elaeis guineensis*.

1.4.3 Morfología

(Bastidas et al, 1989), menciona las siguientes variedades:

- **Dura:** Su fruto tiene un endocarpo de más de 2 mm de espesor. El mesocarpo contiene fibras dispersas y generalmente es delgado.
- **Pisifera:** No tiene endocarpo. La almendra es desnuda. El mesocarpo no tiene fibras y ocupa gran cantidad del fruto. Esta variedad solo se

utiliza para mejorar la variedad dura, debido a que produce poca cantidad de frutos en el racimo.

- **Tenera:** Es el híbrido del cruce entre Pisifera y Dura. Tiene un endocarpo de menos de 2 mm de espesor. En el mesocarpo se encuentra un anillo con fibras.

1.4.4 Descripción botánica y sintomatología

La palma de aceite es una planta grande, con un penacho de hojas y un solo tallo en forma de columna. Su apariencia característica, "desordenada" en contraste con el cocotero, se debe al ángulo irregular de inserción de los foliolos a lo largo del raquis de la hoja (Hartley C, 1988). La (Figura 1), presenta la descripción botánica de la palma.

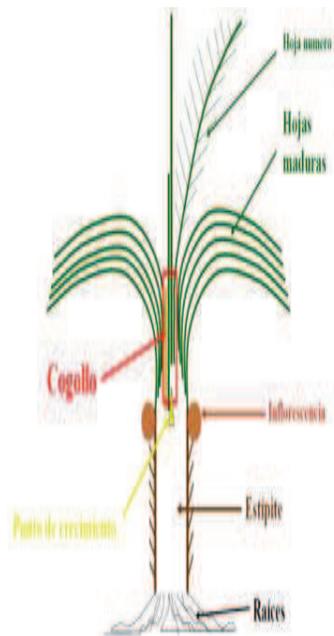


Figura 1. Descripción botánica de una palma aceitera (Martínez et al., 2009).

El cogollo es una parte de la palma que está por encima del punto meristemático o punto de crecimiento donde están ocurriendo toda la formación de los tejidos encontrándose a la altura de los racimos e incluye

tejidos muy jóvenes que son los más sensibles a la enfermedad. Cuando esta se desarrolla inicia el proceso de infección y comienzan a aparecer los síntomas que ha ocasionado el patógeno en los tejidos (Martínez et al., 2009).

1.4.5 Híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*)

Con el propósito de tener un cultivo con una alta tasa de producción de fruto y aceite, baja tasa de crecimiento, tolerancia a enfermedades, aceite con alto contenido de ácidos grasos insaturados y carotenos, se aplicó una metodología para el mejoramiento acelerado de la palma de aceite que permite obtener hasta tres generaciones en 10 años, tiempo que tarda un ciclo genético tradicional en palma de aceite, esto se desarrolló en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica - en la Estación Experimental El Mira, Tumaco (Bastidas et al, 2005).

La (Tabla 1), muestra los índices de calidad de aceite tomados de (Choo et al, 1997) y (Sharma M, 1999).

Tabla 1

Índices de calidad de aceites. Tomado de: (Bastidas et al, 2005) .

Tipo de palma	Carotenos totales (mg·kg ⁻¹)	Vitamina E total (ppm)	Índice de yodo	Ácidos grasos insaturados, mono y di-insaturados (%)
Ténera Corpoica El Mira	1.355,7	1.551,7	53,3	51,6
Palma Oleífera	4.300 – 4.600 ²	700 – 1.000 ²	92,6 ¹	78,8 ²
Híbrido F1 (OxG)	1.200 – 2.400 ²	800 – 1.000 ²	70,0 ¹	58,9 ²
Híbrido 'RC1' (OxG) xG	ND	ND	63,7 ¹	Intermedio entre (OxG) y G ²

¹ Valores reportados por Sharma (1999) en Malasia para palmas Noli de origen colombiano, para F1's Noli Colombia x Palma Nigeria y para RC1's (Noli Colombia x Palma Costa de Marfil) x Palma Nigeria.

² Valores reportados por Choo et al. (1997) para carotenos, vitamina E y esteroides en aceites de *E. guineensis*, *E. oleífera* y sus híbridos.

El problema que presentan los híbridos es su infertilidad, por lo que se debe realizar polinizaciones frecuentes para que aumente la producción y exista un mayor rendimiento (Meunier J, 1991)

Hasta ahora los híbridos, expuestos a la enfermedad parecen haber heredado la tolerancia de su pariente oleífera. Todo ocurre como si esta especie transmitiera un factor dominante (Meunier J, 1991).

La Pudrición de Cogollo (PC) ha sido descrita por varios autores, (Mariau D, 1992), y (Swinburne T, 1993), quienes apreciaron una sintomatología general, bastante constante en las fases tempranas de la enfermedad, la cual se puede desarrollar de forma distinta, dependiendo de las situaciones en las cuales se encuentran las palmas afectadas. Las diferencias referentes al ataque de la enfermedad, conciernen frecuentemente con el avance de la pudrición hacia el meristema y la facultad de las plantas para una recuperación de los síntomas observados.

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 aparece a continuación un desorden de los tejidos que se extiende hasta los puntos de crecimiento (Tovar M, 2006).

La enfermedad se agrava por la intervención de *Rhynchophorus palmarum* L, un insecto que causa daño directo en la planta por el desarrollo de larvas, las cuales se alimentan de los tejidos tiernos del meristemo, ayudando al ataque de la enfermedad. Por eso, cuando las palmas están muy enfermas se procede a su quema (Laing D, 2010).

1.4.6 Microorganismos asociados a la pudrición de cogollo

A lo largo del tiempo se han identificado un sin número de microorganismos en plantas de palma aceitera que presentaban los síntomas de la PC.

Así, los primeros síntomas de la pudrición de cogollo en palma de aceite, datan en 1928, donde se señala que durante ese período el síndrome de la PC fue observado en África Central, síntomas similares también fueron descritos en la región de Sibiti, en el Congo, Colombia, como los Llanos Orientales, el Magdalena, Tumaco, Guapi y, posiblemente, fue la responsable de la desaparición de los cultivos en el Bajo Calima en el departamento del Valle del Cauca (Dzido et al., 1978).

Existen trabajos previos realizados sobre la PC, donde se percibió una fuerte asociación entre bacterias y hongos, especialmente los del género *Fusarium spp.* En Ecuador, se precisa las primeras observaciones sobre la PC en 1976, pero es probable que la enfermedad haya estado presente allí durante varios años (Dzido et al., 1978).

En América Latina, se realizó aislamientos microbiológicos de las palmas afectadas, mostrando el predominio de cepas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* y bacterias en los tejidos enfermos. Los esfuerzos por inocular artificialmente estos microorganismos, separadamente o asociados, no reprodujeron los síntomas de la enfermedad (Franqueville H, 2001).

Hoy, Colombia, Ecuador y Brasil son el epicentro de problemas relacionados con la PC. En la (Tabla 2) se presenta un resumen histórico de algunos tipos de microorganismos que han sido aislados en diversos estudios.

Tabla 2

Resumen de la historia de los principales estudios fitopatológicos acerca de la pudrición de cogollo en *Elaeis guineensis* y microorganismos asociados aunque sin pruebas para satisfacer los Postulados de Koch. Tomado de: (Laing D, 2010)

Investigadores	Fecha	País palmero	Entidad principal	Organismos propuestos
Reinking ¹	1928	Panamá	United Fruit Co.	<i>Fusarium moniliforme</i>
Ghesquiere ¹	1935	Congo D.R.	Bélgica	<i>Phytophthora palmivora</i> , <i>Bacillus coli</i>
Bachy ¹	1954	Congo Rep.	Francia	<i>Fusarium</i> y bacterias
Duff ³	1963	Congo D.R.	Hermanos Lever	<i>Erwinia lathyri</i>
Renard et al. ¹	1964	Colombia	CIRAD Francia	<i>Fusarium</i> (<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>)
Renard et al. ¹	1976	Colombia	CIRAD Francia	<i>Fusarium</i> (<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>)
Harper et al. ¹	1982	Ecuador	Univ. Auburn USA	<i>Fusarium</i> y bacterias
Quillec et al. ¹	1983	Ecuador	Orstom Francia	<i>Phytophthora</i>
Van Gundy ¹	1983	Ecuador	Univ. de California	Nemátodos <i>Helicotylenus</i>
Renard ²	1986	Brasil	CIRAD-Embrapa	Pythium
Singh et al. ⁷	1988	Brasil	Embrapa Hortalizas	Viroides (ácidos nucleicos)
Silva ⁴	1989	Brasil	Denpasa	Hongos/bacterias (27 esp. identificadas)**
Nieto y Gómez ¹	1991	Colombia	Cenipalma	<i>Fusarium solani</i>
Dollet ¹	1991	Ecuador	CIRAD/IRHO	Virus o viroides (ARN de doble brin)
Beuther et al. ¹	1992	Brasil	Univ. Dusseldorf	Viroides (ARN de doble brin)
Allen et al. ¹	1995	Ecuador	Univ. de California	<i>Erwinia</i>
Nieto ¹	1996	Colombia	Cenipalma	<i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Thielaviopsis</i>
De Franqueville ¹	1998	Ecuador	CIRAD Francia	<i>Fusarium</i>
Nieto y Gómez ¹	1999	Colombia	Cenipalma	<i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Thielaviopsis</i>
Sánchez ¹	1999	Colombia	Cenipalma	<i>Phytophthora</i>
Trindade et al. ²	2000	Brasil	Embrapa-CPATU	Fitoplasma
Gómez ¹	2000	Colombia	Cenipalma	<i>Thielaviopsis paradoxa</i>
Martínez et al. ⁵	2008	Colombia	Cenipalma	<i>Phytophthora palmivora</i>
Torres et al. ⁶	2009	Colombia	Cenipalma	<i>Phytophthora palmivora</i>

Fuente: ¹De Franqueville (2001); ²Boari (2008) en Brasil; ³Duff (1963); ⁴Silva et al. (1995); ⁵Martínez et al. (2009); ⁶Torres et al. (2010) y ⁷Singh et al. (1988).

** Ver Tabla 2 para identificación adicional de los 27 microorganismos.

1.4.7 Propiedades físicas del suelo que permiten el desarrollo de la PC.

La enfermedad está relacionada con un drenaje insuficiente, los suelos compactos, densos provocando la asfixia del sistema radicular (Hartley C, 1965). La pudrición de cogollo dependería de otros factores, entre estos, factores climáticos, diversos desordenes nutritivos, tales como, niveles bajos de fosforo, potasio, zinc, cobre, altos niveles de calcio y magnesio, exceso de nitrógeno, también los niveles de hierro y manganeso en la tierra (Chinchilla C. Durán N, 1999).

1.4.8 Pudrición de cogollo en plantas de vivero

La pudrición de cogollo afecta a plantas de vivero y plantas jóvenes en campo, donde se la conoce como pudrición seca de corazón, llegando a causar la muerte hasta de un 3% de las plantas al tercer año de edad, y siendo más grave cuando hay replante porque puede matar hasta el 25-35% de las plantas (Chávez M, 1986).

Los síntomas iniciales se caracterizan por un retraso en el crecimiento de la fecha, seguido de un amarillamiento en las hojas jóvenes. En los folíolos basales de las flechas, aparecen unas manchas redondas u ovaladas de características aceitosas y anulares.

Existe necrosis que avanza internamente provocando una degeneración de aspecto seco de los tejidos, en especial del área meristemática. En plantas de más de dos años aparece una coloración violácea característica de los tejidos que circundan el ápice meristemático. En estados más avanzados de la enfermedad, el sistema radical se va necrosando, con un proceso degenerativo que comienza en los ápices de las raíces (Martínez et al., 2009).

1.4.9 Escala de Severidad

Se refiere a la cantidad de tejido de la planta que se encuentra afectado por la pudrición de cogollo. Esta es una medida visual y subjetiva, por lo tanto está sujeta a variaciones y errores de agudeza visual del evaluador.

Los síntomas inician al observarse un amarillamiento de hojas nuevas, según reportó (Zucker et al., 1972), las palmas muestran una clorosis leve de folíolos inferiores de una de las hojas centrales, amarillamiento de las hojas jóvenes y un colapso o caída de la flecha próxima a ser hoja número 1.

En muchos casos avanza por el paquete central de las hojas hasta afectar la zona meristemática eliminando la posibilidad de emitir nuevas hojas y deteniendo el desarrollo normal de una planta sana. Cuando hay recuperación de las plantas se observa inicialmente la emisión de hojas y folíolos cortos y posteriormente hojas cada vez más normales. El síntoma característico de la PC conduce al colapso de las flechas, pero la situación más grave se presenta en el cogollo de la planta, donde se observa pudrición severa de los tejidos más tiernos, que puede tener diferentes grados de severidad teniendo una recuperación notoria en los grados menos severos, hasta la formación de un cráter por la muerte y descomposición de los tejidos en altos grados de severidad (Martínez L. Torres L. , 2007).

Otro síntoma que pueden presentar las plantas es un secamiento de los folíolos en palmas adultas, este es el primer ataque del organismo que inicia el proceso de infección (Martínez L. Torres L. , 2007) . La (Figura 2), muestra la escala de severidad de la pudrición del cogollo.

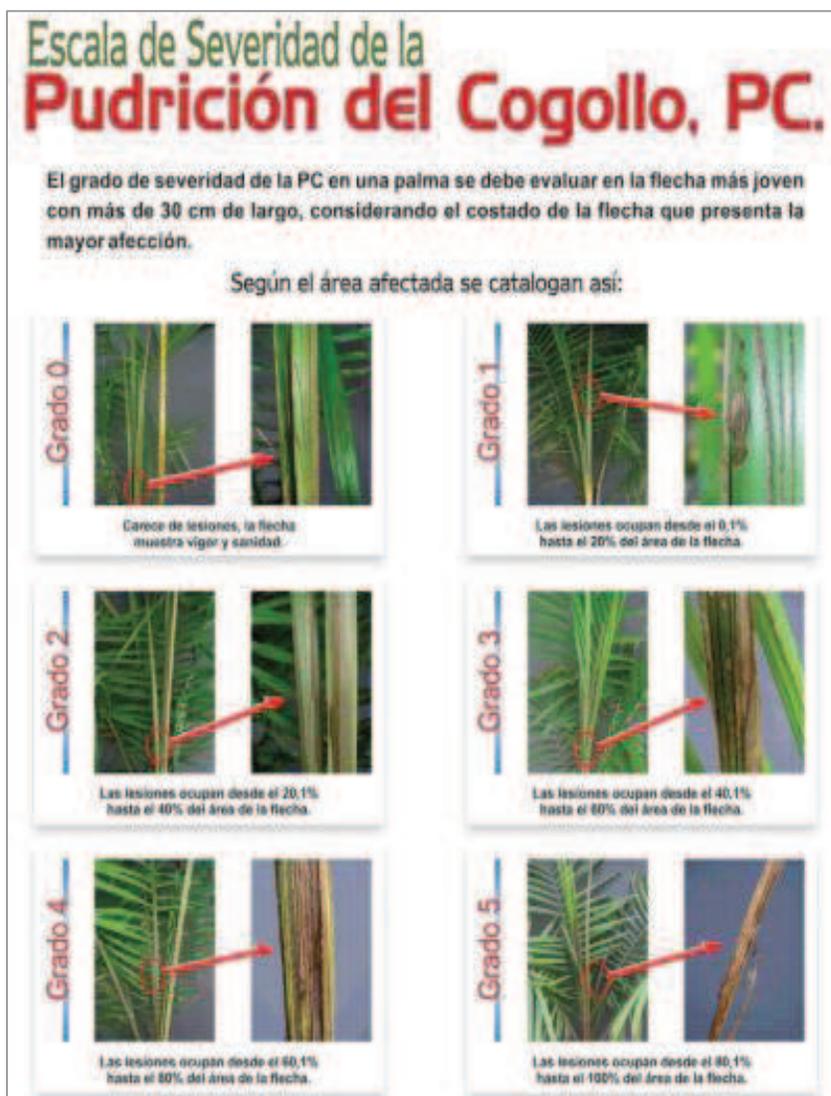


Figura 2. Escala de severidad de la pudrición de cogollo Fuente: (González N, 2010).

La pudrición de las flechas se manifiesta de dos maneras de acuerdo con las condiciones climáticas: una pudrición simple, caracterizada por afectar partes de los folíolos cerrados de las flechas, es seca de progreso lento, y de fácil recuperación; y otra severa de flechas con manchas acuosas brillantes en las zonas de avance, desciende y afecta rápidamente los folíolos y raquis de otras flechas próximas hasta llegar cerca del meristemo. (Nieto P, 1996).

1.4.10 Índices de diversidad

La Organización de las Naciones Unidas, define a la diversidad biológica como la variabilidad de los organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, los ecosistemas terrestres, marinos, otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas.

Generalmente se diferencian tres niveles de biodiversidad: genética dentro de especies, taxonómica en número de especies y ecológica en hábitats, comunidades y ecosistemas (Kikkawa J, 1990).

Esta investigación se va a enfocar en la biodiversidad de comunidades, refiriéndose a la diversidad de especies. En esta, se diferencia dos componentes uno es la riqueza o número de especies y la otra es la equidad o distribución de los individuos entre las especies (Melo & Vargas, 2010).

Generalmente en las evaluaciones biológicas, se usan índices de diversidad que responden a la riqueza de especies y a la distribución de los individuos entre las especies, la estimación se realiza a través de diferentes índices, los más usados son el de Shannon- Wiener (H), Equitabilidad de Shannon (J'), el de Simpson (λ), Recíproco de Simpson (1/D) (Lara, 2009).

Índice de Simpson

Este índice, toma en cuenta la dominancia de las especies con mayor representatividad y es uno de los parámetros que nos permiten medir la riqueza de organismos (Pielou E, 1969).

A medida que el índice se incrementa, la diversidad decrece. Por ello el Índice de Simpson, se presenta habitualmente como una medida de la dominancia, como se acaba de indicar (Pielou, 1969).

El índice de Simpson se refiere a la probabilidad de que dos individuos de una comunidad grande, tomados al azar, pertenezcan a la misma especie (Pielou, 1969).

$$D = \sum p_i^2 ; D = \sum [ni(ni-1) / N(N-1)]$$

Dónde:

p_i = Abundancia proporcional

ni = Número de individuos de i ésima especie

N = Número de individuos totales

Recíproco de Simpson

Una forma de medir la diversidad es por medio del índice recíproco de Simpson (Krebs C, 1989).

$$\frac{1}{D} = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$$

donde D es el índice de Simpson y p_i es la proporción de individuos de la especie i .

El índice de Simpson varía de 0 hasta 1, mientras que el recíproco varía de 1 hasta s , el número de especies.

Índice de Shannon

Este índice mide la heterogeneidad de la comunidad, el valor máximo será indicador de una situación en la cual todas las especies son igualmente abundantes. El índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (abundancia) (Marrugan A, 2001).

$$H' = -\sum_{i=1}^S (pi)(\log_2 pi)$$

Dónde:

H' = Diversidad de Shannon

pi = (ni / N) = abundancia proporcional (relativa)

E = Uniformidad de Shannon

S = Número total de especies en el muestreo

Equitabilidad de Shannon

Se refiere a que tan uniformemente están distribuidos los individuos entre las especies. La equitabilidad puede tener valores entre 0 y 1, en donde 1 representa una situación en donde todas las especies son igualmente abundantes (Marrugan A, 2001).

$$J' = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

$$H'_{\max} = \ln(S)$$

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Participantes.

El presente estudio se realizó en cooperación de Palmeras de los Andes San Lorenzo y AGROCALIDAD. Con la colaboración del Ingeniero. Marco Martínez, jefe técnico del área de polinización de Palmera de los Andes San Lorenzo, el apoyo de la Dra. Verónica Ramírez y del Msc. Martín Marcial, responsables del área de fitopatología de la Agencia Ecuatoriana del Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD).

2.1.1. Responsable del proyecto

Edison Oswaldo Vega Hidalgo

2.1.2. Colaboradores científicos

Ing. Marco Taipe Director de tesis

PhD. Jéssica Duchicela Codirector de tesis

2.2 Zona de Estudio.

El proyecto se desarrolló en dos etapas:

Trabajo de campo: Las plantaciones experimentales, están localizadas en el sector de Najurunjo y Chanul 2 con coordenadas (N: 0745585; S: 0134590) UTM y (N: 152040; S: 857983) UTM respectivamente, en Palmeras 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.

2.3 Periodo de Tiempo de investigación.

Fecha de inicio: 19 de Agosto del 2013.

Fecha de Finalización: 31 de Julio del 2014.

2.4 Diseño estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar, en el cual se hizo un análisis estadístico descriptivo, donde las variables cualitativas fueron las muestras de: tallo, flecha y raíz de dos plantas de palma aceitera por cada grado de severidad que éstas presentaban, (Anexo A), tanto para *Elaeis guineensis* Jacq como para el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), mientras que las variables cuantitativas, fueron los índices de diversidad (Shannon (H), equitabilidad de Shannon (J'), Simpson (λ), el recíproco de Simpson ($1/D$)) y la cantidad de microorganismos presentes en cada uno de los tejidos de la planta.

2.5 Procedimiento

2.5.1 Muestreo.

Se tomaron muestras en campo, de plantas adultas (Figura 3), *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).



Figura 3. Muestreo de palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Para la colección del material vegetal, se utilizó motosierra, palas, machetes con las que se tumbaron cada una de las plantas, una vez tomadas las muestras se procedió a quemar los restos para evitar la propagación de la enfermedad a plantas sanas (Figura 4). Las muestras fueron envueltas en papel periódico, colocadas en bolsas de polietileno, identificadas con códigos y colocadas correctamente en el recipiente térmico, a una temperatura de 4° C (Duarte S, 2007), para su traslado inmediato al laboratorio.



Figura 4. Equipo de muestreo utilizado y quema del material contaminado.

2.5.2 Procesamiento de las muestras

Se seleccionó muestras de tallo, flecha y raíz, después se pesó 10g de cada uno de los tejidos. Posteriormente se lavaron las muestras con agua potable para retirar los restos de materia orgánica. En la desinfección se utilizó hipoclorito de sodio al 2% por 20 segundos y se procedió a lavar tres veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de cloro (Echandi, 1967).

Para el aislamiento de bacterias, recuento de hongos y bacterias se cortaron trozos pequeños con sintomatología en las muestras, estos a su vez fueron triturados en un mortero dentro de la cámara de flujo laminar (Figura 5), 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 (Echandi, 1967).

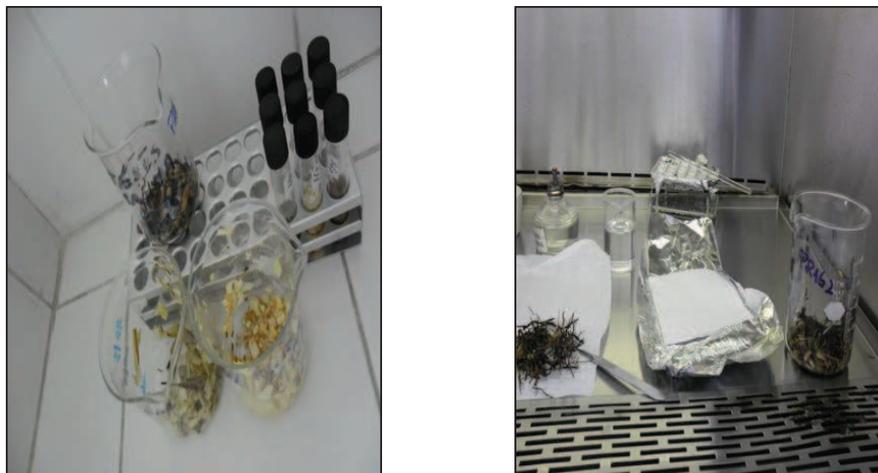


Figura 5. Preparación y aislamiento de las muestras

Con una pipeta estéril de 1 ml se transfirió la suspensión de microorganismos a los tubos restantes que contenían 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 (Anexo 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) (French & Hebert, 1980).

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 (French & Hebert, 1980).

Posteriormente se purificaron bacterias en Agar Nutritivo, momento en el cual se procedió a contar cada una de las colonias en un contador de colonias Quebec (Rojas A, 2011).

Después de la purificación, las colonias se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas, tales como:

Oxidasa: Determina la presencia de enzimas oxidasas, para esto se uso diclorhidrato de tetrametil4p4fenilendiamina (TPD) al 1%, si el color al momento de inocular la bacteria fue azul el resultado es positivo, caso contrario negativo (Bailon et al, 2003).

Catalasa: Permite determinar la presencia de la enzima catalasa, que es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en agua y oxígeno. La reacción es considerada positiva, cuando al añadir el inoculo en el agua oxigenada existe la presencia de burbujas que corresponde a la liberación de oxígeno (Suslow T, 1982).

Oxidativo/Fermentativo: Las bacterias utilizan hidratos de carbono, sea por procesos metabólicos, fermentativos u oxidativos. Se diferencia por la necesidad de oxígeno atmosférico y una fosforilación inicial. Para esto se inocularon dos tubos con el medio y uno de ellos se selló con 5 ml de parafina para impedir la entrada de oxígeno. Así, una prueba de oxidación es positiva si el tubo abierto, presenta una coloración amarilla y el tubo cerrado una

coloración verde. Por otro lado, la prueba de fermentación será positiva, si el tubo abierto tiene una coloración verde y el tubo sellado una coloración amarilla (Bailon et al, 2003).

Prueba KOH: Se realiza con una solución de KOH al 3%, que es muy rápida y sencilla. Si se forma un hilo al momento de colocar el inoculo en la solución, entonces la reacción es positiva y se considera que pertenece al grupo de las bacterias gram negativas, sino se forma el hilo la bacteria es un miembro de las gram positivas (Loredo J, 2008).

Tinción Gram: Es una técnica que permite diferenciar las bacterias gram negativas y gram positivas. Las bacterias que retienen el cristal violeta, se tiñen de morado y son gram positivas, las que se decoloran con el alcohol y adquieren una coloración roja son gram negativas.

Motilidad: Determina si un organismo es móvil o inmóvil, debido a que las bacterias presentan uno o más flagelos, por lo tanto esta reacción es considerada positiva si existe turbidez en el medio, debido al desplazamiento de las bacterias, pero si el crecimiento sigue la línea de siembra es considerada negativa (Loredo J, 2008).

Licuefacción: Consiste en determinar, que organismos producen enzimas de tipo proteolítico que licuan la gelatina. Para esto, se incubo las bacterias por 24 horas a 33°C, después se colocó en el refrigerador a una temperatura de 36°C por dos horas.

Los tubos que presentaron la licuefacción de la gelatina, fueron considerados como positivos (Suslow T, 1982). En la (Figura 6), se puede apreciar las pruebas bioquímicas que se realizó en el laboratorio.



Figura 6. Pruebas bioquímicas para bacterias.

Para el aislamiento de hongos, se hizo de la misma forma que para bacterias, inmediatamente se colocaron trozos pequeños de la muestra en cada cuadrante de la caja Petri con medio PDAac y se dejó en la estufa por 7 días, esto se realizó en dos repeticiones (French & Hebert, 1980).

Posteriormente se realizó el proceso de identificación mediante la observación al microscopio y utilización de claves taxonómicas. Se preparó, colocando lacto-fenol en un porta objetos, luego con un bisturí, se colocó micelio del hongo de interés y sobre este se puso un pedazo de cinta scotch, el exceso se lo retiro con papel absorbente y se observó al microscopio (Rojas A, 2011).

La purificación de hongos se realizó en la cámara de flujo laminar (Figura 7), 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 (Rojas A, 2011).

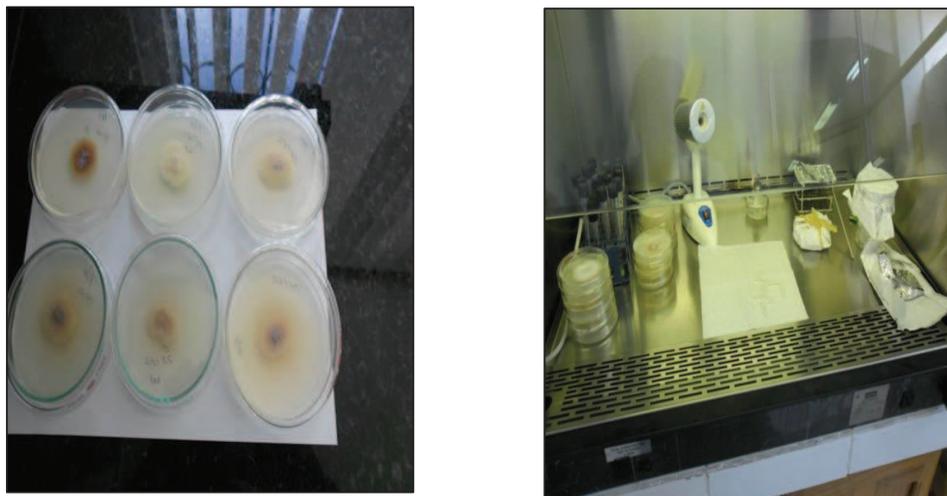


Figura 7. Purificación de hongos.

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 (Anexo B) permitiendo comprobar que lo anteriormente aislado era *Fusarium* (Leslie et al., 2006).

2.5.3 Identificación de hongos y bacterias mediante el sistema Biolog

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 (Anexo C). 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 (Figura 8). Para la lectura de hongos se realizó por 7 días cada 24 horas (BIOLOG, 2011).



Figura 8. Equipo de identificación Biolog

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% (BIOLOG, 2007).

2.5.4 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 (Waites et al., 2001).

2.4.6 Conservación de hongos

Los hongos identificados fueron conservados con sucrosa 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 (Waites et al., 2001).

2.5.5 Preparación de microcultivos

Esta técnica se realizó con el objetivo de que el micelio no se fragmente al momento de mirarlo al microscopio (Figura 9), permitiendo realizar medidas de las esporas de los hogos, mediante la utilización del microscopio Olympus BX43, equipado con el software cellSens 1.9_en_02_Krishna_16 August 2013.

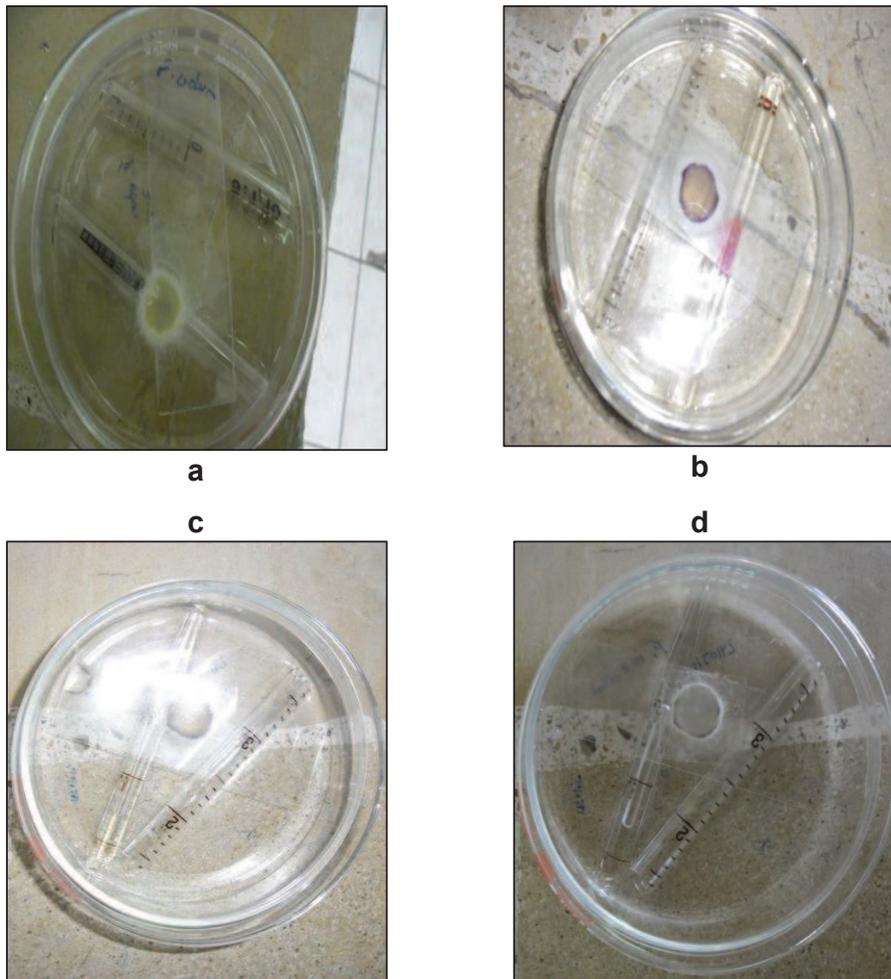


Figura 9. a) *Fusarium udum* E. Butler, b) *Fusarium solani*, c) *Fusarium decemcellulare*, d) *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell.

2.6 Análisis de Datos

Los géneros y especies obtenidos fueron agrupados utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace con el software estadístico BioDiversity Pro versión 2. Se realizó también, un análisis de correspondencia simple con el software estadístico InfoStat versión libre 2008. La cantidad y la biodiversidad de hongos y bacterias fueron realizadas con el software Microsoft Excel 2010.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

En esta investigación, se realizó la identificación, estimación de la abundancia y diversidad de hongos y bacterias, presentes en muestras de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). Posteriormente, se hizo una selección basada en las características morfológicas de bacterias y hongos fitopatógenos. Para explicar los resultados obtenidos, se dividió en dos fases: la primera: caracterización morfológica e identificación de especies bacterianas; y la segunda: caracterización morfológica e identificación de especies de hongos, que se realizaron mediante la utilización del sistema Biolog, en las dos variedades de palma aceitera.

3.1 Fase 1: Identificación Bacteriana

3.1.1 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). A estos aislados se hicieron pruebas bioquímicas cuyos resultados se muestran en la (Tabla 3).

Tabla 3

Pruebas bioquímicas realizadas a cada una de las cepas bacterianas de *Elaeis guineensis* Jacq.

CÓDIGO DE MUESTRA	PRUEBAS BIOQUÍMICAS							
	CATALASA	OXIDASA	OXIDO / FERMENTATIVA	TINCIÓN GRAM	KOH	LICUEFACCIÓN	MOTILIDAD	COLOR
P1R0G0 10 E ⁻² YDC	+	+	+	-	+	+	-	Crema
P1F0G0 10 E ⁻² YDC	+	+	+	-	+	+	-	Crema
P1M0G0 10 E ⁻² YDC	+	+	+	-	+	+	-	Crema
P1R1G1 10 E ⁻³ YDC	+	+	+	+	-	+	-	Verde
P2M1G1 10 E ⁻³ YDC	+	+	+	-	+	+	+	Crema
P1M2G2 10 E ⁻³ YDC	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P1R3G3 10 E ⁻³ YDC	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P2R3G3 10 E ⁻³ BK	+	+	+	+	-	-	-	Crema
P1F3G3 10 E ⁻³ YDC	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P1M3G3 10 E ⁻³ YDC	+	+	+	-	+	+	+	Crema
P1M3G3 10 E ⁻³ BK	+	+	+	-	+	+	+	Crema
P2R4G4 10 E ⁻³ YDC	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P1R4G4 10 E ⁻³ BK	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P2F4G4 10 E ⁻² YDC	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P1F4G4 10 E ⁻³ BK	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P2R5G5 10 E ⁻³ BK	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P1R5G5 10 E ⁻³ YDC	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P1M5G5 10 E ⁻³ BK	+	+	+	+	-	+	+	Crema
P1F5G5 10 E ⁻² YDC	+	+	+	+	-	+	+	Crema

(+): Reacción positiva del microorganismo.

(-): Reacción negativa del microorganismo.

Posteriormente, se realizó un análisis (Figura 10) de Grupos con el software estadístico BioDiversity Pro, versión 2 (Written Neil McAleece Devised by PJD Lamshead. GLJ Paterson and JD Gage 1997 The Natural History Museum & The Scottish Association for Marine Science), que permitió clasificar las colonias bacterianas, según el porcentaje de similitud de las pruebas bioquímicas mencionadas anteriormente, para (*Elaeis guineensis* Jacq.).

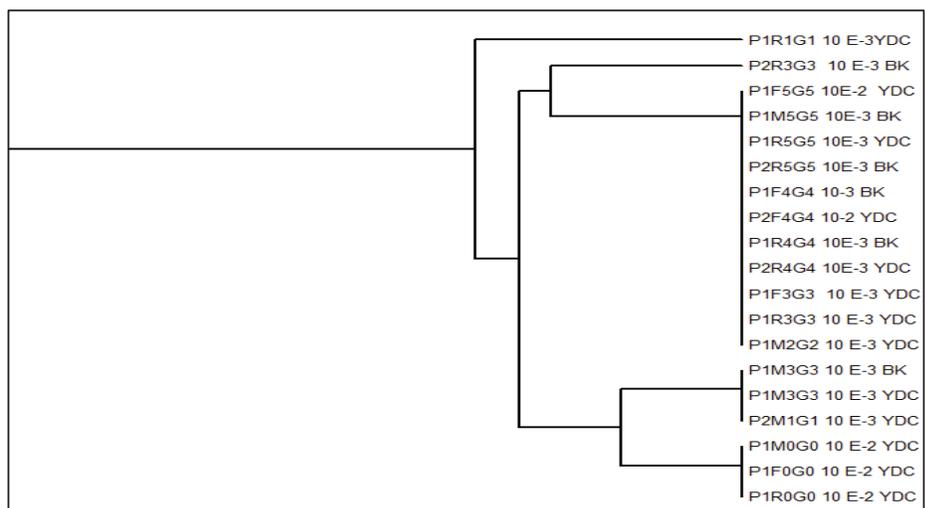


Figura 10. Dendrograma de similitud, generado para bacterias asociadas a la pudrición de cogollo en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jac, utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.

En el dendrograma anterior, a un 85,7% y 90,9% de similitud se aprecian dos y cuatro grupos respectivamente bien diferenciados, cada uno de ellos con las especies agrupadas según las pruebas bioquímicas mencionadas anteriormente.

3.1.2 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) a las cuales se les hizo las pruebas bioquímicas respectivas (Tabla 4).

Tabla 4

Pruebas bioquímicas realizadas a cada una de las cepas bacterianas del híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

CÓDIGO DE MUESTRA	PRUEBAS BIOQUÍMICAS							
	CATALASA	OXIDASA	OXIDO / FERMENTATIVA	TINCIÓN GRAM	KOH	LICUEFACCIÓN	MOTILIDAD	COLOR
H1ROGO 10E-3 YDC	+	+	+	-	-	+	-	Crema
H1ROGO 10E-3 YDC	+	+	+	-	-	+	+	Amarillo
H1ROGO 10E-3 BK	+	-	-	+	+	+	-	Verde
H1FOGO 10E-3 YDC	+	+	+	-	-	+	-	Crema
H1FOGO 10E-3 BK	+	-	+	+	+	+	-	Crema
H1R1G1 10E-2 Bk	+	-	-	-	-	+	-	Crema
H1R1G1 10E-2 YDC	+	-	-	-	-	+	-	Crema
H2R2G2 10E-2 YDC	+	-	-	-	-	+	-	Crema
H2R2G2 10E-3 YDC	+	+	+	-	-	+	+	Amarillo
H2M2G2 10E-3 YDC	+	+	+	-	-	+	+	Amarillo
H1M2G2 10E-3 BK	+	+	+	-	-	+	+	Crema
H1F2G2 10E-3 YDC	+	+	+	-	-	+	+	Amarillo

(+): Reacción positiva del microorganismo.

(-): Reacción negativa del microorganismo.

Se realizó un análisis de Grupos (Figura 11) con el software estadístico BioDiversity Pro, versión 2, que permitió clasificar las colonias bacterianas, según el porcentaje de similitud.

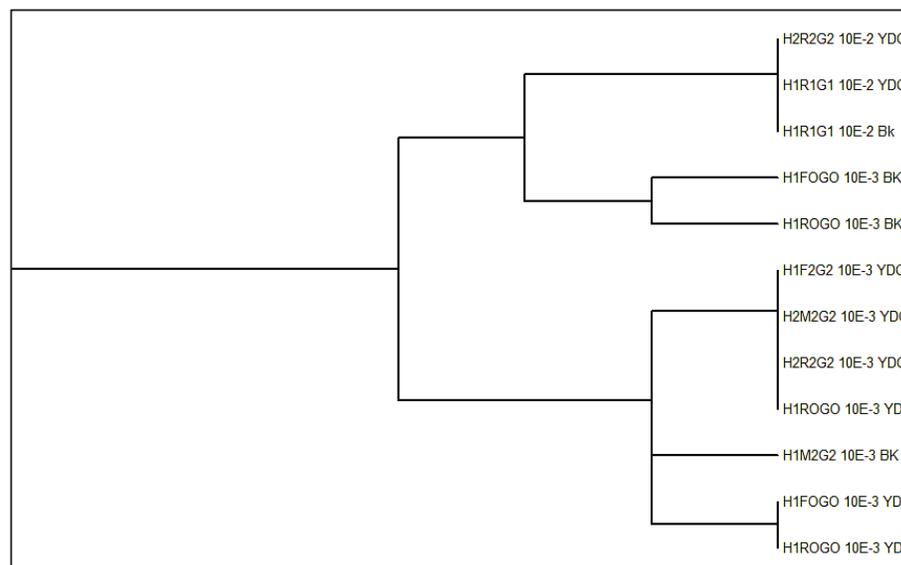


Figura 11. Dendrograma de similaridad, generado para bacterias asociadas a la pudrición de cogollo en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera x Elaeis guineensis*), utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.

Al 83,3% de similaridad se observa 3 clusters y 90,9% de similaridad se puede apreciar 6 clusters, cada uno de ellos con las cepas bacterianas agrupadas según las pruebas bioquímicas realizadas.

Del análisis anterior, se seleccionó las cepas bacterianas: P1R1G1 10⁻³ YDC, P1R3G3 10⁻³ BK, P1R5G5 10⁻³ YDC, P1M3G3 10⁻³ BK, P1M0G0 10⁻²YDC, H1F0G0 10⁻³ BK, H1R1G1 10⁻² YDC, H1F0G0 10⁻³ YDC, H1R0G0 10⁻³ BK, H1M2G2 10⁻³ YDC, H1F2G2 10⁻³ YDC, para luego proceder a utilizar el sistema de identificación Biolog obteniendo los siguientes resultados (Tabla 5).

Tabla 5

Identificación de especies bacterianas en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), mediante la utilización del sistema de identificación Biolog.

Especies bacterianas en <i>Elaeis guineensis</i> Jacq	
CÓDIGO	ESPECIE
P1R1G1 10 ⁻³ YDC	<i>Pseudomonas fulva</i>
P1R3G3 10 ⁻³ BK	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
P1R5G5 10 ⁻³ YDC	<i>Bacillus pumilus</i>
P1M3G3 10 ⁻³ BK	<i>Pantoea agglomerans</i>
P1M0G0 10 ⁻² YDC	<i>Acinetobacter ursingii</i>
Especies bacterianas en el híbrido interespecífico	
H1F0G0 10 ⁻³ BK	<i>Pseudomonas viridilivida</i>
H1R1G1 10 ⁻² YDC	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>
H1F0G0 10 ⁻³ YDC	<i>Pantoea agglomerans</i>
H1R0G0 10 ⁻³ BK	<i>Micrococcus lylae</i> C
H1M2G2 10 ⁻³ BK	<i>Paenibacillus taichungensis</i>
H1F2G2 10 ⁻³ YDC	<i>Bacillus pumilus</i>

Los resultados del sistema Biolog, de las diferentes especies bacterianas en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq, y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) se encuentran en el Anexo E.

3.1.3 Índices de diversidad para la identificación de especies bacterianas

Después, se realizó el índice de diversidad de Shannon (H), el índice de equitabilidad de Shannon (J'), el índice de Simpson (λ) y el recíproco de Simpson ($1/D$), para las cepas bacterianas analizadas en los dos especímenes de palma aceitera.

A continuación se presentan las (Figuras 12 y 13), para las dos variedades de palma aceitera.

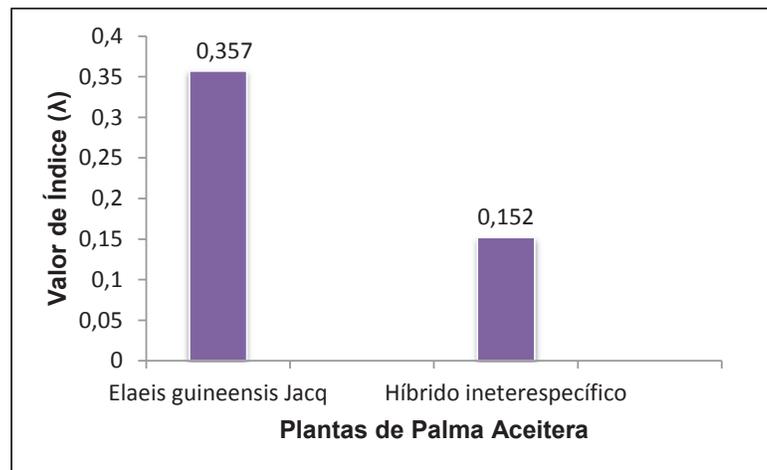


Figura 12. Índice de Simpsons en plantas de palma aceitera

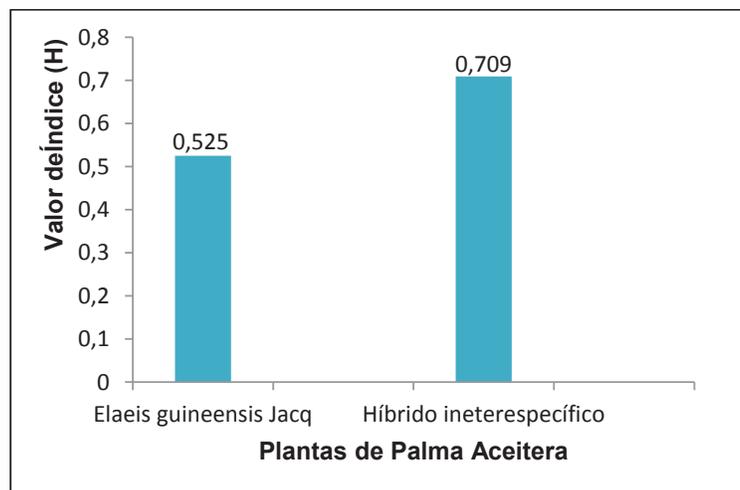


Figura 13. Índice de Shannon en plantas de palma aceitera

También, se realizó la estadística descriptiva de los índices de diversidad (Tabla 6). Donde se observa, que la desviación estándar (4,1) y la media (3,8) obtenidas en *Elaeis guineensis* Jacq., son mayores a la desviación estándar (1,12) y la media (2) del híbrido interespecífico.

Tabla 6

Estadística descriptiva de los índices de diversidad para las dos variedades de palma aceitera.

<i>Elaeis guineensis</i> Jacq		Híbrido (O * G)	
Media	3,8	Media	2
Desviación estándar	4,14728827	Desviación estándar	1,26491106
Varianza de la muestra	17,2	Varianza de la muestra	1,6
Mínimo	1	Mínimo	1
Máximo	11	Máximo	4

En la (Figura 14), 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*).

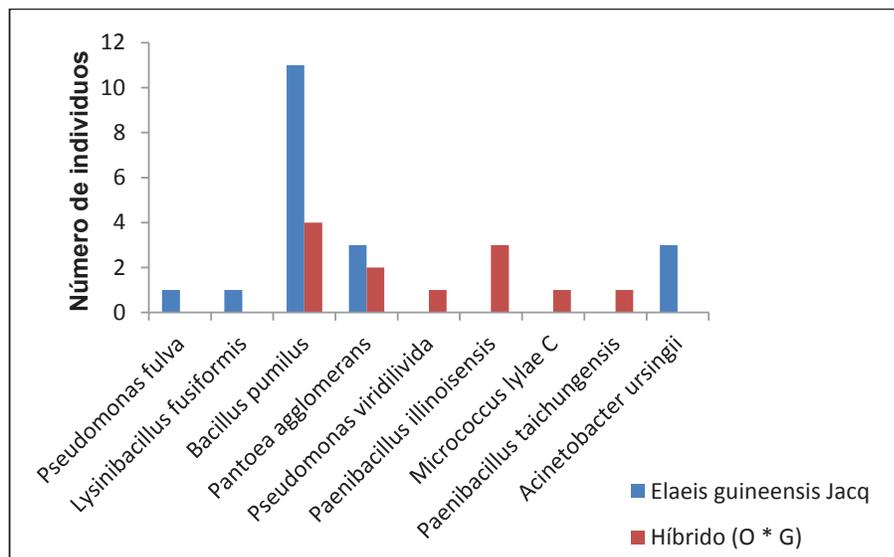


Figura 14. Especies bacterianas obtenidas en las dos variedades de palma aceitera.

Así, se hace un resumen de los índices de diversidad (Tabla 7), obtenidos en el análisis de bacterias en las dos variedades de palma aceitera

Tabla 7

Índices de diversidad bacteriana obtenidos en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Índices de diversidad	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq	Híbrido ininterespecífico
Índice de Shannon	0,525	0,709
Equitabilidad de Shannon (J')	0,751	0,911
Índice de Simpson	0,357	0,152
Recíproco de Simpson (1/D)	2,069	6,562

3.1.4 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*).

En las (Figuras 15 y 16), se puede apreciar el recuento microbiano, expresado en unidades formadoras de colonias de las especies bacterianas obtenidas, en las dos variedades de palma aceitera.

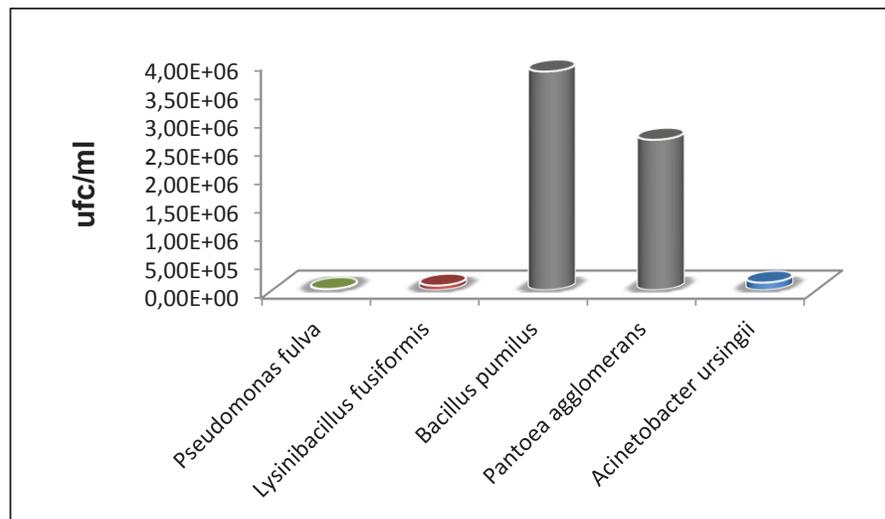


Figura 15. Recuento bacteriano en *Elaeis guineensis* Jacq.

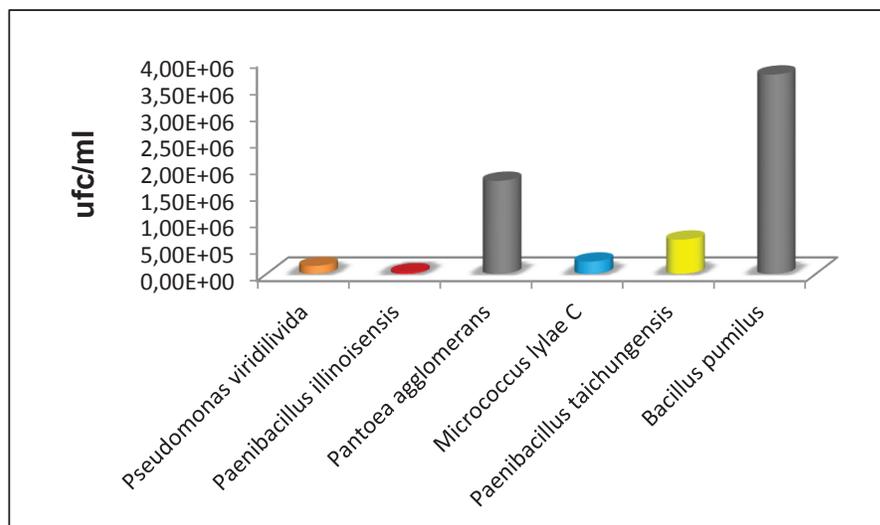


Figura 16. Recuento bacteriano en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*).

Como resultado de estos gráficos, se observa que *Bacillus pumilus* presenta (3832000 ufc/ml), seguido por *Pantoea agglomerans* con (2640000 ufc/ml) en *Elaeis guineensis* Jacq. En el híbrido, en cambio existe (3730000 ufc/ml) de *Bacillus pumilus* y *Pantoea agglomerans* (1740000 ufc/ml).

3.1.5 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. Esto se observa en las (Figuras 17 y 18), para palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y para el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) respectivamente.

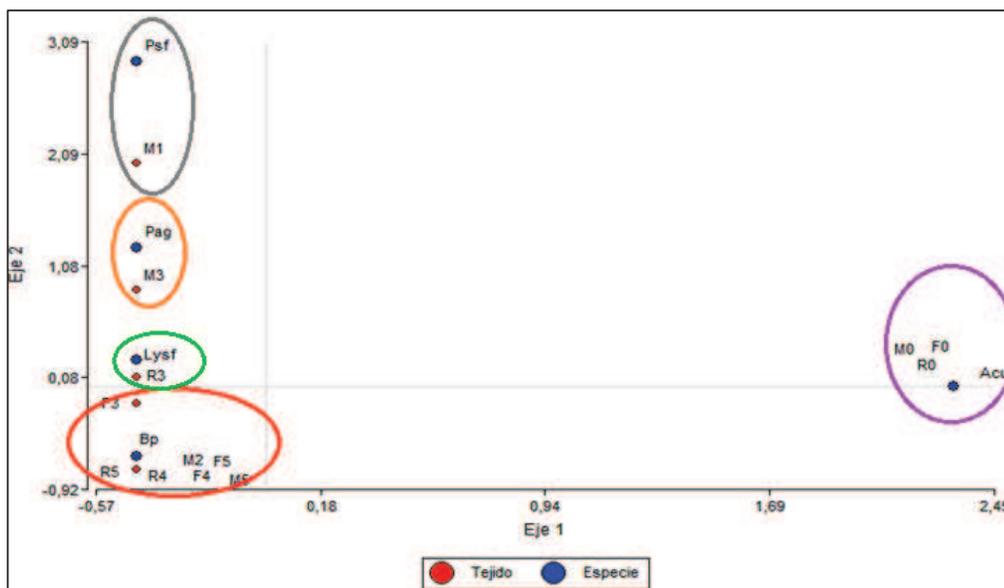


Figura 17. Análisis de correspondencia simple para las variables; tejidos y especies bacterianas, identificadas en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq.

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).

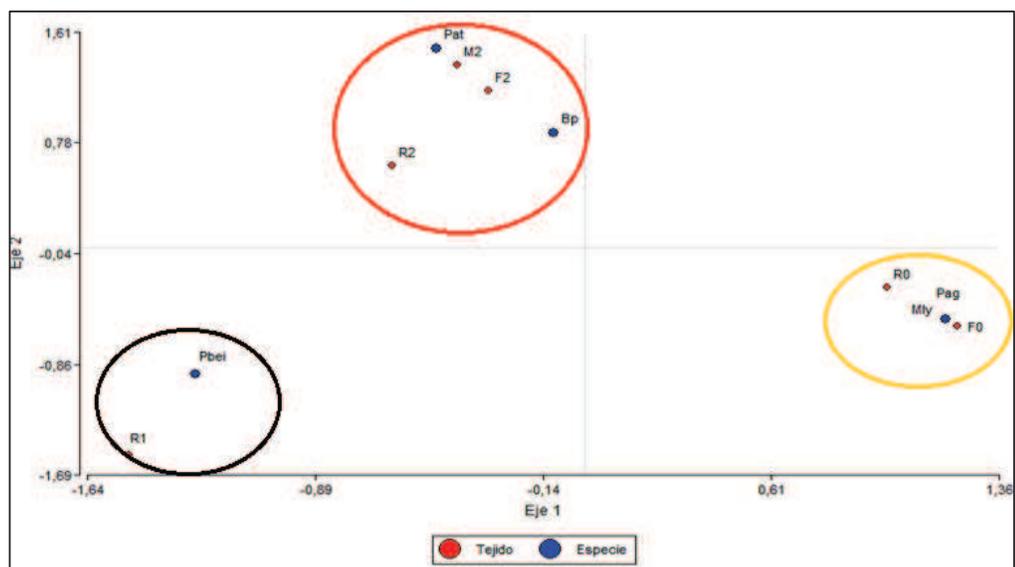


Figura 18. Análisis de correspondencia simple para las variables; tejidos y especies bacterianas identificadas en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

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).

3.2 Fase 2: Identificación de hongos

Se realizó 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., los cuales 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.

3.2.1 Caracterización morfológica e identificación de hongos en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq.

A continuación, se muestra los resultados de hongos (Tabla 8) obtenidos en palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq).

Tabla 8

Hongos aislados de palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq.

Código de Muestreo	Forma de la espora	Forma de las Hifas	Color del micelio	Aspecto del micelio	Genero	Especie
P2R1G1	Ovoide sin septos	Cenocíticas	Blanco	Algodonoso	<i>Colletotrichum</i> spp.	N.I
P1M1G1	Curvado con septos	Septadas	Negro	Algodonoso	<i>Curvularia</i> spp.	N.I
P1M1G1	Sin esporas	Septadas	Verde con blanco	Algodonoso	<i>Rhizoctonia</i> spp.	N.I
P1F1G1	Ovoide sin septos	Cenocíticas	Blanco	Algodonoso	<i>Colletotrichum</i> spp.	N.I
P1F1G1	Sin esporas	Septadas	Verde con blanco	Algodonoso	<i>Rhizoctonia</i> spp.	N.I
P1R2G2	Ovoide sin septos	Cenocíticas	Blanco	Algodonoso	<i>Colletotrichum</i> spp.	N.I
P1M2G2	Semiluna Grandes, septadas	Septadas	Blanco	Algodonoso	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium decemcellulare</i> Brick
P1F2G2	Curvada, septadas con extremos redondos	Septadas	Amarillo ligero	Algodonoso	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium solani</i>

Continua



P1F2G2	Ovoide sin septos	Cenocíticas	Blanco	Algodonoso	<i>Colletotrichum</i> spp.	N.I
P1F2G2	Ovoide sin septos	Cenocíticas	Blanco	Algodonoso	<i>Colletotrichum</i> spp.	N.I.
P1R3G3	Ligeramente curvada septadas, con una célula apical	Cenocíticas	Rosado ligero	Algodonoso	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium udum</i> E. Butler
P1R3G3	Esféricas	Cenocíticas	Blanco	Aterciopelada	<i>Pythium</i> spp.	N.I
P1R3G3	Sin esporas	Septadas	Verde con blanco	Algodonoso	<i>Rhizoctonia</i> spp.	N.I
P1R3G3	Ovoide sin septos	Cenocíticas	Blanco	Algodonoso	<i>Colletotrichum</i> spp.	N.I
P1R5G5	Esféricas	Septadas	Verde	Polvoso	<i>Penicilium</i> spp.	N.I
P1F3G3	Ovoide sin septos	Cenocíticas	Blanco	Algodonoso	<i>Colletotrichum</i> spp.	N.I
P2M5G5	Ligeramente curvada, septadas, con una célula apical	Cenocíticas	Rosado ligero	Algodonoso	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium udum</i> E. Butler
P2M4G4	Sin esporas	Septadas	Verde con blanco	Algodonoso	<i>Rhizoctonia</i> spp.	N.I
P1F1G1	Curvada, septadas con extremos redondos	Septadas	Amarillo ligero	Algodonoso	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium solani</i>

N.I: No identificado

Se realizó un análisis de Grupos con el software estadístico BioDiversity Pro versión 2 (Written Neil McAleece Devised by PJD Lambshead. GLJ Paterson and JD Gage 1997 The Natural History Museum & The Scottish Association for Marine Science), que permitió agrupar las colonias de hongos según el porcentaje de similitud de las pruebas morfológicas para (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Figura 19).

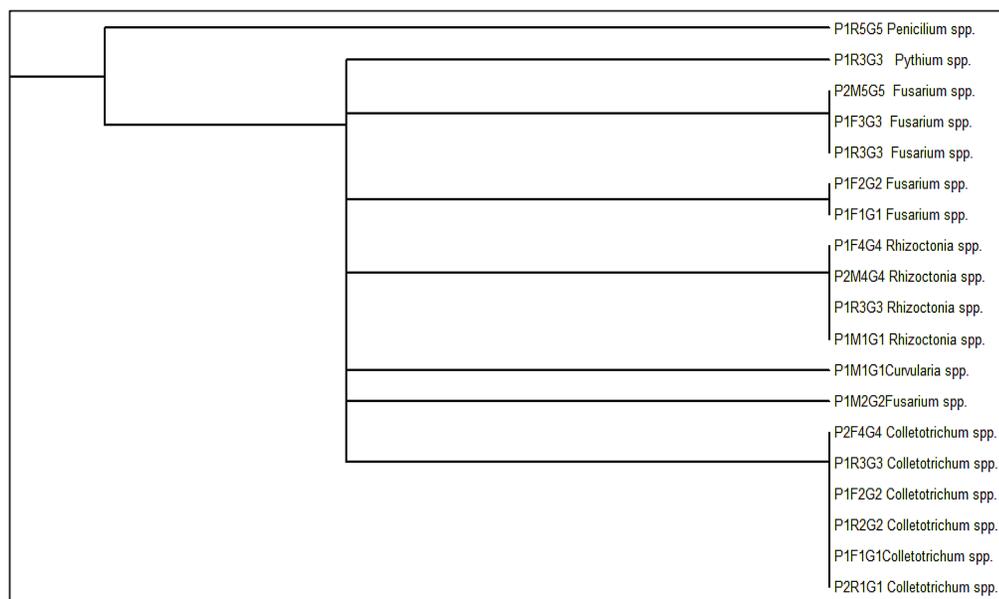


Figura 19. Dendrograma de similitud, generado para hongos asociados a la pudrición de cogollo en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jac, utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.

En el dendrograma, al 90% de similitud se puede observar ocho grupos, cada uno de ellos se encuentran conformados con sus respectivas especies.

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

Se realizó, la identificación de las cepas de hongos fitopatógenos obtenidos (Tabla 9), en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Tabla 9

Hongos aislados en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*).

RESULTADO DE HONGOS AISLADOS EN EL HIBRIDO INTERESPECÍFICO						
Código de Muestreo	Forma de las esporas	Tamaño de Hifas	Color del micelio	Forma del micelio	Genero	Especie
H0F0G0	Semiluna ligeramente curvada	Septadas	Blanco	Algodonoso	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell
H1R1G1	Esféricas	Septadas	Verde	Polvoso	<i>Penicillium</i> spp.	N.I
H1R2G2	Ovoide sin septos	Cenocíticas	Blanco	Algodonoso	<i>Colletotrichum</i> spp.	N.I
H2F1G1	Ovoide sin septos	Septadas	Verde oscuro	Polvoso	<i>Trichoderma</i> spp.	N.I
H1R2G2	Ovoide sin septos	Septadas	Verde oscuro	Polvoso	<i>Trichoderma</i> spp.	N.I

N.I: No identificado

A continuación, se hizo un análisis de Grupos con el software estadístico BioDiversity Pro (Figura 20).

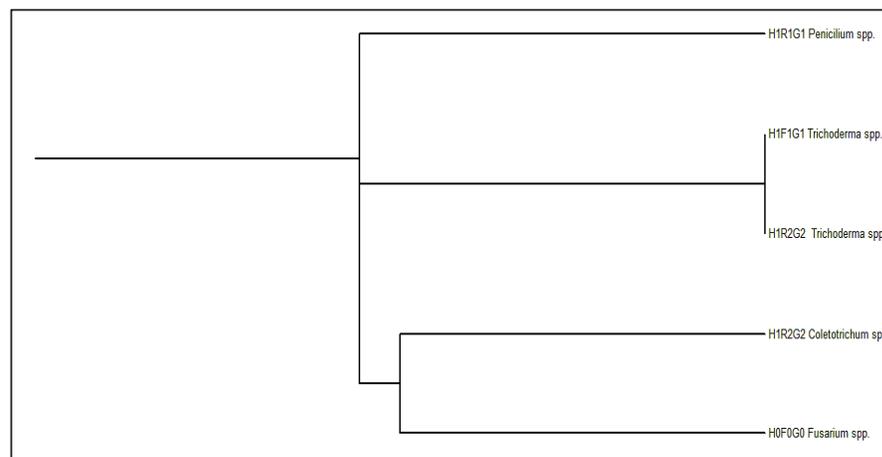


Figura 20. Dendrograma de similaridad, generado para hongos asociados a la pudrición de cogollo en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*), utilizando la medida de similitud de Bray Curtis y el método de agrupación de un solo enlace.

El dendograma del híbrido interespecífico, presenta tres grupos cada uno de ellos agrupados al 50% de similitud.

Posteriormente, se realizó los índices de diversidad de Shannon (H), el índice de equitabilidad de Shannon (J'), el índice de Simpson (λ) y el recíproco de Simpson ($1/D$) en los dos tipos de palma aceitera. Ver (Figura 21) para *Elaeis guineensis* Jacq y (Figura 22) para el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*).

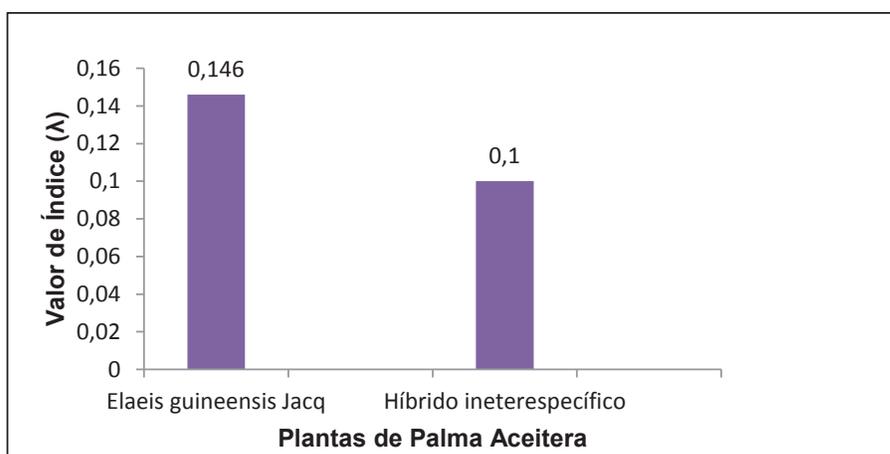


Figura 21. Índice de Simpson en plantas de palma aceitera

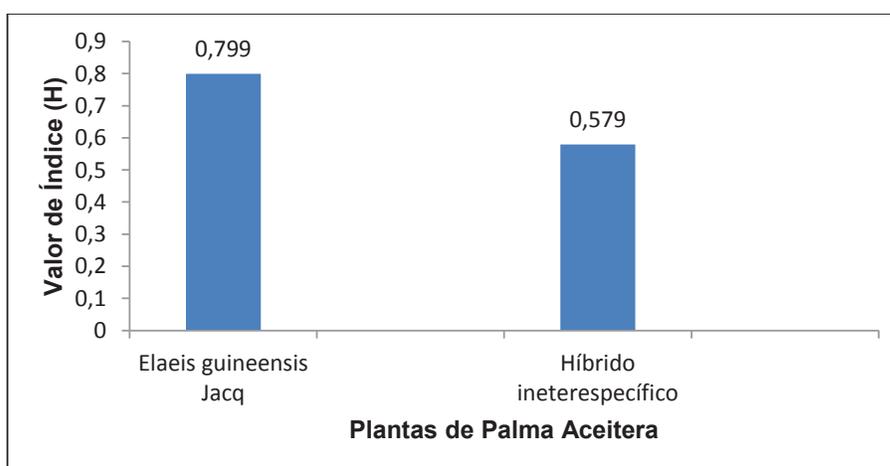


Figura 22. Índice de Shannon de las plantas de palma aceitera.

Además, se realizó la estadística descriptiva de los índices de diversidad (Tabla 10), en la cual se observa, que la desviación estándar (2,8) y la media (2,3) obtenidas en *Elaeis guineensis* Jacq., son mayores a la desviación estándar (0,44) y a la media (1,2) del híbrido interespecifico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Tabla 10

Estadística descriptiva para la identificación de hongos de los índices de diversidad para las dos variedades de palma aceitera.

<i>Elaeis guineensis</i>		Híbrido (0*G)	
Media	2,33333333	Media	1,2
Desviación estándar	2,82842712	Desviación estándar	0,4472136
Varianza de la muestra	8	Varianza de la muestra	0,2
Mínimo	1	Mínimo	1
Máximo	9	Máximo	2

A continuación, se indica el número de individuos de las diferentes especies de hongos (Figura 23), obtenidos en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecifico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

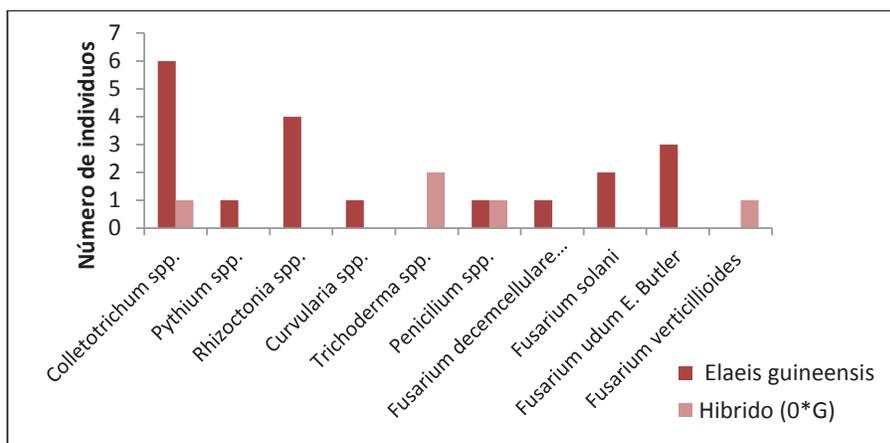


Figura 23. Especies bacterianas obtenidas en las dos variedades de palma aceitera.

En la (Tabla 11) se muestra un resumen de los índices de diversidad, obtenidos en la identificación de hongos en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Tabla 11

Índices de diversidad para hongos obtenidos en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Índices de diversidad	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq	Híbrido inerespecífico
Índice de Shannon	0,799	0,579
Equitabilidad de Shannon (J')	0,885	0,961
Índice de Simpson	0,146	0,1
Recíproco de Simpson (1/D)	6,841	10

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

Se realizó un recuento de hongos cuyos resultados se observan en la (Figura 24) para el híbrido interespecífico y la (Figura 25) para *Elaeis guineensis* Jacq.

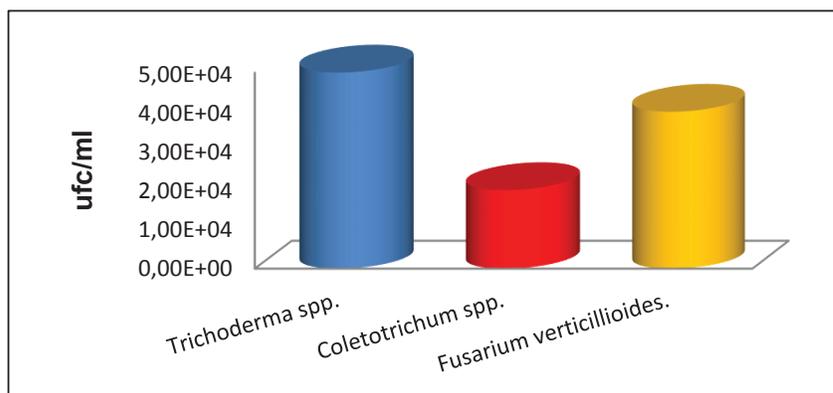


Figura 24. Recuento de hongos en en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

Se puede apreciar que *Trichoderma* spp., es el hongo que tiene (50000 ufc/ml) en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), seguido por *Fusarium verticillioides* con (40000 ufc/ml).

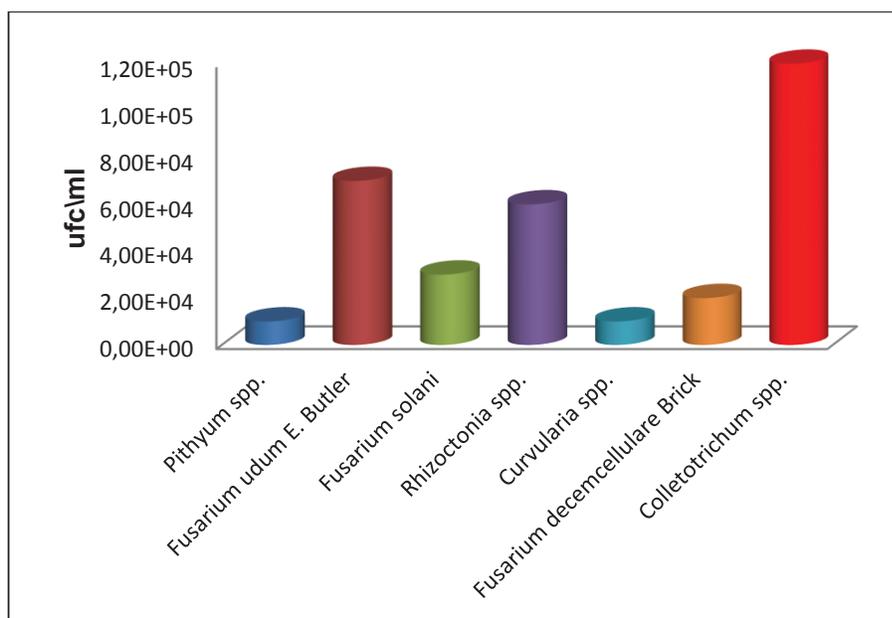


Figura 25. Recuento de hongos en *Elaeis guineensis* Jacq

En el grafico se observa, que *Colletotrichum* spp., presenta (120000 ufc/ml), *Fusarium udum* E. Butler (70000 ufc/ml) y *Rhizoctonia* spp. (60000 ufc/ml) en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq.

3.2.4 Análisis estadístico de correspondencias simple para hongos.

Al igual que para bacterias, se realizó con el software InfoStat versión libre 2008, se tomó como variables, los tejidos de palma aceitera y las especies de hongos identificadas. Figuras 26 y 27, para palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq y para el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*) respectivamente.

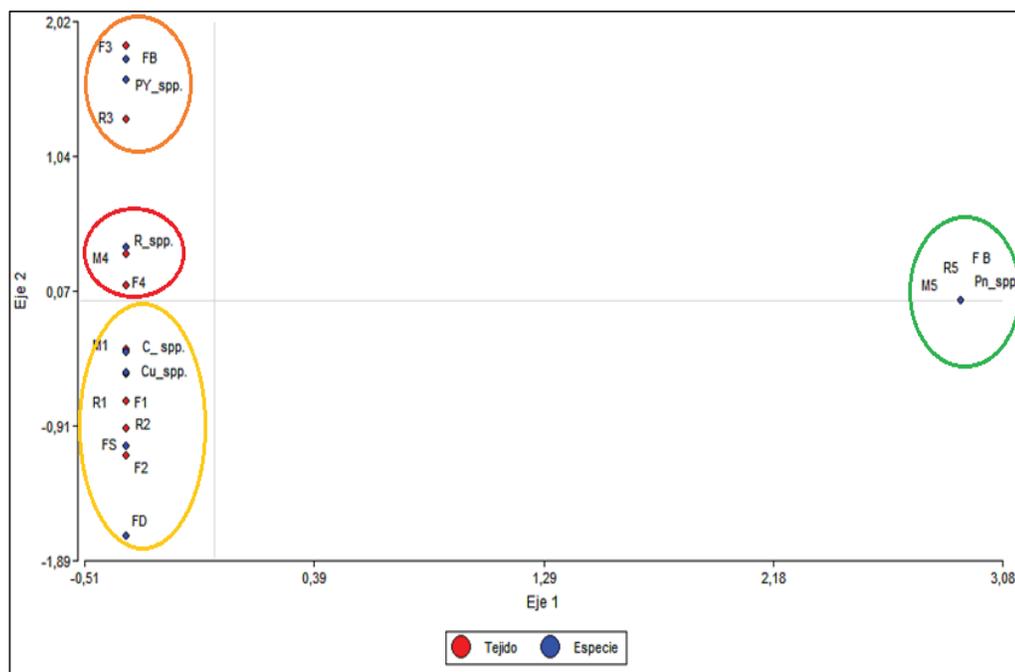


Figura 26. Análisis de correspondencia simple para las variables de tejidos y especies de hongos identificadas en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq.

El gráfico 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).

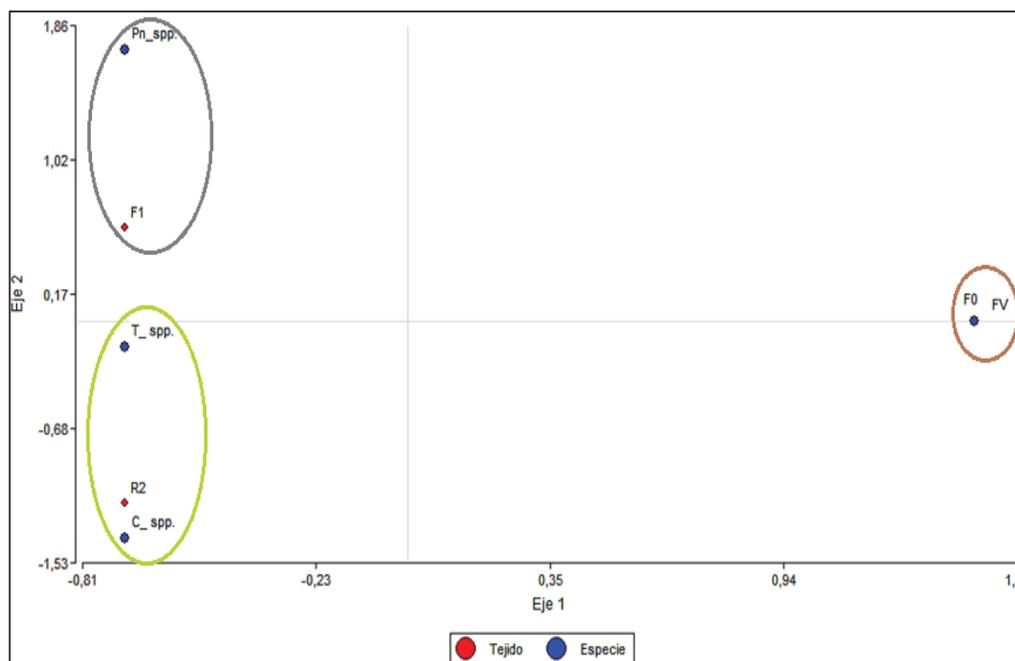


Figura 27. Análisis estadístico de correspondencia simple para las variables tejidos de palma aceitera y las especies de hongos identificadas en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*).

En el gráfico 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). *Penicillium* spp. (Pn_spp.), está en flecha grado 1 (F1). *Fusarium verticillioides* (*Saccardo*) Nirenberg & O' Donnell se encuentra en flecha grado 0 (F0).

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

Se realizaron pruebas morfométricas, con 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 biolog (Figura 28).

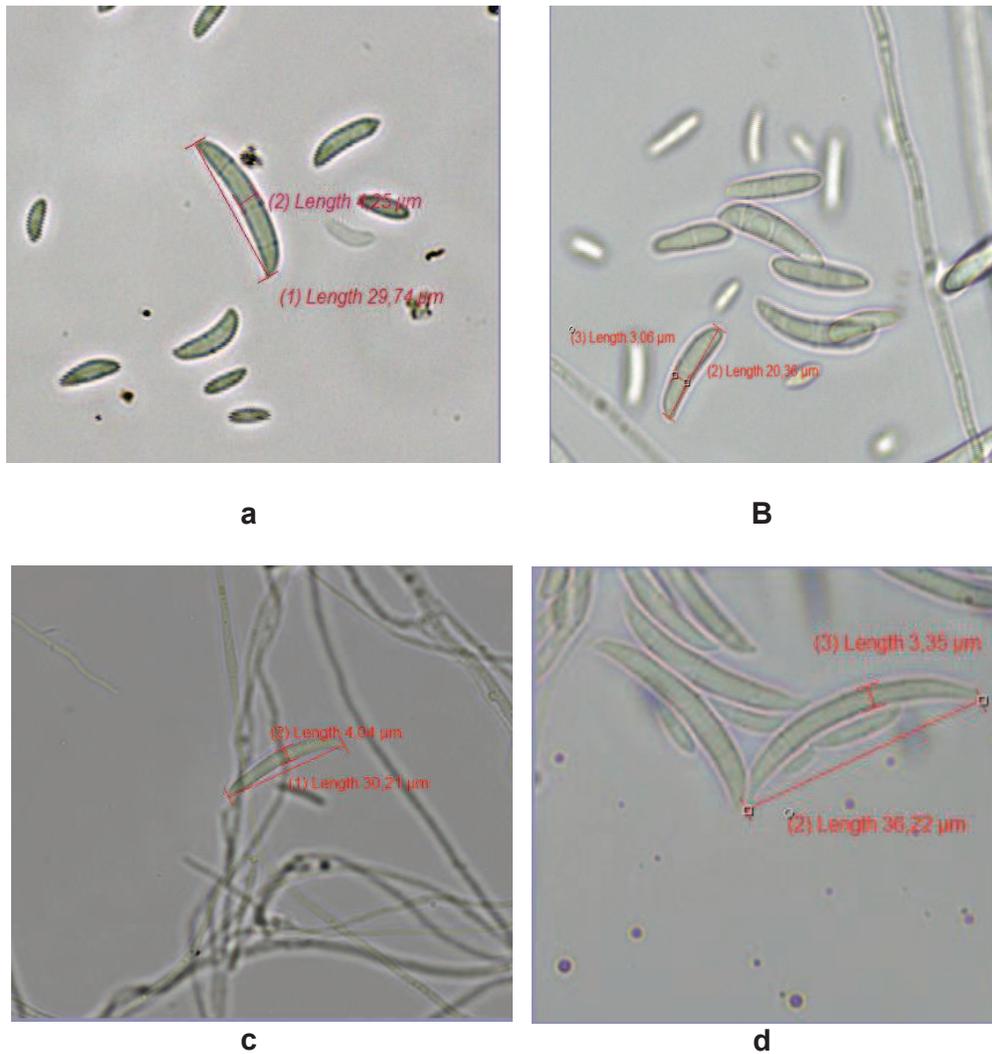


Figura 28. Morfometría en palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq: a) *Fusarium decemcellulare* Brick, b) *Fusarium udum* E. Butler, c) *Fusarium solani*. En el híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*): d) *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg & O' Donnell.

CAPÍTULO 4: 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 oleifera* x *Elaeis guineensis*) presentó, *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 14, 15 y 16).

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 (Holt et al., 1994). Esto concuerda, con todas las pruebas bioquímicas realizadas en las dos variedades de palma aceitera analizadas en este estudio (Tablas 3 y 4).

Este género, tiene una amplia distribución en diferentes tipos de ambiente como el suelo (Aslim, 2002) y los ecosistemas de agua dulce (Manda M, 2005). 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 (Stephens C, 1998). Así mismo, presenta resistencia a cambios bruscos de temperatura debido a que cuenta con genes de shock térmico, que inducen proteínas

chaperonas o proteasas (Petersohn et al., 2001), permitiéndole tener una capacidad metabólica exitosa para colonizar el ambiente rizosférico.

Entre las bacterias fitopatógenas productoras de enzimas, con la capacidad de macerar tejidos, se encuentran *B. pumilus*. (Chiu et al., 1964) menciona que *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. 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 17 y 18).

A continuación, se mencionan 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.) (Galal A, 2006). 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, reportados por los siguiente autores: (Hseu et al., 2010), lo reporta en 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 (Font et al., 2010); muerte regresiva de hojas y ramas de la pera asiática (*Pyrus pyrifolia*) (Li et al., 2009). 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 (Cen J, 2012).

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).

Según (Jimenez et al., 2004), 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. Además, se la ha determinado como causante de clorosis y necrosis de las zonas foliares de palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* K) (Sánchez et al., 2003). 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 (Zucker et al., 1972), característica que no se encuentra limitada a estos patógenos en particular (Cuppels D. Kelman A, 1974).

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 (Anexo F).

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 (Tabla 7).

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 L, 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 (Vargas J, 2009). Esto concuerda con los datos obtenidos (Tabla 7), 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).

Adicionalmente, se calculó el índice de *Jaccard (Ij)*, el cual indica que existe un 22,22% de similitud entre las cepas de bacterias encontradas en los dos tipos de palmas aceiteras (Clements et al., 2002). Ver (Anexo D).

Cabe recalcar, que el cálculo de la cantidad, la estimación de la abundancia y diversidad de bacterias fitopatógenas, se realizó en los grados de severidad (0 al 5) en palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) y en los grados de severidad (0 al 2) en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), debido a que este presenta mayor tolerancia a la enfermedad y al control fitosanitario que la plantación realiza.

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 colocó en el refrigerador (Waites et al., 2001).

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 (Vargas J, 2009). En esta investigación, se obtuvo este hongo, 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 (Pérez et al., 2012). Por otro parte, *Fusarium udum* E. Butler ha sido reportado, como causante del marchitamiento de las raíces de guisantes, identificado en la india (Joshi S, 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 (Soldevilla C, 1995). También es uno de los causantes de la pudrición en banano (Zeng et al., 2013). 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 (Domsch, 2007).

De las especies mencionadas anteriormente (Figura 24), 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 25), 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, es totalmente diferente en las dos variedades de palma aceitera (Figuras 26 y 27).

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*) (Tabla 11). Esto quiere decir, que el grado de incertidumbre es alto debido a que no se puede predecir a que especie pertenecerá un individuo tomado a la azar 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 (Newman et al., 2003).

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 (Pielou E, 1969). Esto concuerda con los datos obtenidos en la (Tabla 11), donde se observa que el índice de Shannon es mayor al índice de Simpson.

Adicionalmente, se calculó el índice de *Jaccard (Ij)*, indicando que existe un 10% de similitud entre las cepas de hongos encontradas en los dos tipos de palmas aceiteras (Clements et al., 2002) (Anexo D).

Cabe recalcar, que el cálculo de la cantidad, la estimación de la abundancia y diversidad de hongos fitopatógenos, se realizó en los grados de severidad (0 al 5) en palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) y en los grados de severidad (0 al 2) en el híbrido interespecífico (*Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*), debido a que este presenta mayor tolerancia a la enfermedad y al control fitosanitario que realiza la plantación.

Para comprobar las especies de *Fusarium* spp., identificadas con el sistema Biolog, se realizó medidas morfométricas para cada uno de ellas (Figura 11), 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 (Renard J, 1991).

Para finalizar, 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 (Waites et al., 2001).

CAPÍTULO 5: 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.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.

Debido, a que algunos géneros de hongos fitopatógenos tales como: *Colletotrichum spp.*, *Curvularia spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Phytium spp.*, no se encontraban en la base de datos del equipo, deberían ser identificados hasta especie con técnicas moleculares, que son más específicas.

Aunque, se realizó los postulados de Koch, infectando tejidos de cebolla perla (*Allium cepa* L) con las especies bacterianas obtenidas, se debe complementar este estudio, realizando infecciones en plantas de palma aceitera, con las bacterias y hongos obtenidos, para ver si es posible reproducir los síntomas de la pudrición de cogollo.

Podría, realizarse estudios complementarios incluyendo virus, nematodos y otros, que influyen en la pudrición de cogollo.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilar et al. (2013). *Bacterias asociadas a la pudrición y secado repentino de la palma de coco (Cocos nucifera L.)*. Recuperado el 28 de 02 de 2014, de http://www.congresofitopatologia.org/Libro_memoria_CPLAF-2013-PERU.pdf
- Aslim. (2002). *Determination of some properties of Bacillus isolated from. Turk J Biol.* (Vol. 26).
- Bailon et al. (2003). *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*. Recuperado el 05 de agosto de 2014, de <http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>
- Bastidas et al. (2005). *Comportamiento agronómico del cultivar híbrido RC1 de Palma de aceite (Elaeis oleifera x Elaeis guineensis) x Elaeis*. Recuperado el 25 de agosto de 2013
- BIOLOG. (2007). *Micro Station™ System MicroLog Version 4.2*. Recuperado el 04 de enero de 2013, de http://wiki.bio.dtu.dk/teaching/images/8/82/MicroStation_System_Version_4.2_User_Guide.pdf
- BIOLOG. (2011). *Microbial Identification*. Recuperado el 08 de agosto de 2013, de http://www.iul-inst.com/nueva/images/biolog_mi_brochure.pdf
- Cen J. (2012). *Determinación del agente causal de la pudrición del cogollo del Agave Tequilana weber var. azul en el estado de Jalisco*. Retrieved febrero 19, 2014, from http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/1747/Cen_Caamal_JC_MC_Fitopatologia_2012.pdf?sequence=1
- Censo Palmero. (2005). *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).
- Chávez M. (1986). *Enfermedades de la palma africana en Ecuador (INIAP)*. Quito, Ecuador.
- Chinchilla C. Durán N. (1999). Nature and management of Spear Rot-like problem in oil palm. *Proceedings of the Porim International Palm Oil Congress (Agriculture)*, 97-126. Costa Rica.

- Chiu et al. (1964). Some bacteria causing decay of Chinese cabbage in storage. En A. Phytopathol.7 (Ed.), (págs. 127-134).
- Choo et al. (1997). Carotenes, vitamin E and sterols in oils from Eguineensis, E. oleifera and their hybrids. .
- Clements et al. (2002). *Community ecotoxicology, Reino Unido. 336 pp. Referenciada: 15/04/2009*. Recuperado el 06 de abril de 2014, de <http://biolambiental.posgrado.unam.mx/pdf/Ejercicios.pdf>
- Cuppels D. Kelman A. (1974). *Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. Phytopathology 64: 468–475*. Recuperado el 08 de agosto de 2013, de http://www.iul-inst.com/nueva/images/biolog_mi_brochure.pdf
- Domsch, K. H. (2007). *Compendium of Soil Fungi, 2nd edition, IHW Verlag, Eching*.
- Duarte S. (2007). *Pruebas de Patogenicidad in vitro con microorganismos aislados de palmas afectadas por marchitez letal*. Recuperado el 05 de julio de 2013, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis96.pdf>
- Dzido et al. (1978). *Les principales maladies dupalmier à huile en Equateur* (Vol. 33). Oléagineux.
- Echandi. (1967). *Isntituto Interamericano de Ciencias Agrícolas*. Recuperado el 17 de noviembre de 2013, de http://www.otca.info/portal/admin/_upload/publicacoes/SPT-TCA-VEN-70.pdf
- Franqueville H. (2001). *La Pudrición del Cogollo de la Palma de Aceite en América Latina. Revisión Preliminar de Hechos y Logros Alcanzados*.
- French & Hebert. (1980). *Métodos de Investigación Fitopatológica (IICA)*. Obtenido de http://books.google.com.ec/books/about/M%C3%A9todos_de_investigaci%C3%B3n_fitopatol%C3%B3gica.html?id=nR8PAQAIAAJ&redir_esc=y
- Galal A. (2006). *Bacillus pumilus a new pathogen on mango plants. Plant Pathol. Dept. Fac. Agric. Minia Univ. Minia-Egypt. 34:17-29*. Recuperado el 03 de octubre de 2013, de http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fc_01_02_och.html.

- González N. (2010). *Manejo de la pudrición del cogollo en las plantaciones "Guaicaramo" Y "Unipalma"*. Recuperado el 16 de febrero de 2014, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/2723/1/nurylilianagonzalezocampo.2010.pdf>
- Hartley C. (1988). *Some notes on the oil palm in Latin America. Oléagineux* 20 (6):359-363.
- Holt et al. (1994). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.*
- Hseu et al. (2010). *Yam bacterial leaf spot caused by Bacillus pumilus. Plant Pathol. Bull.* 19: 213-224.
- Jimenez et al. (2004). *European Journal of Plant Pathology, Issue Volume 110. Number 3 pp. 317-331.*
- Joshi S. (2001). *Pathogenic Variability in Pigeonpea Wilt Pathogen Fusarium udum Butler in Nepal.* Recuperado el 07 de abril de 2013, de http://narc.gov.np/publicaton/pdf/journal/Vol4/pathogenic_variability_pigeonpea_wilt_pathogen.pdf
- Kikkawa J. (1990). *Biological diversity of tropical forest ecosystems (Vol. B). IUFRO, IXX World Congress. Montreal.*
- Krebs C. (1989). *Ecological methodology. Harper Colliins Publishers, New York.*
- Laing D. (2010). *Causa de la pudrición de cogollo en palma de aceite. Papel del calcio en una hipótesis abiótica-edáfica.* Recuperado el 20 de noviembre de 2013, de <http://www.secsuelo.org/XIICongreso/Simposios/Nutricion/Magistrales/1.%20Douglas%20Laing.pdf>
- Lara. (2009). *Determinar los índices de diversidad y florística de las especies arbóreas y regeneración natural en las 6 PPMs del proyecto FOMABO en el valle de sacta.*
- Leslie et al. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual.* Malden.
- Li et al. (2009). *Association of a Bacillus Species with Leaf and Twig Dieback of Asian Pear (Pyrus pyrifolia) in china. Plant Pathology.*
- Loredo J. (2008). *Manual de prácticas de bacteriología.* Recuperado el 05 de agosto de 2014

- Manda M. (2005). *Plasmid-Mediated dimethoate degradation by Bacillus licheniformis isolated from a fresh water fish labeo rohita*. *J. Biomed. Biotechnol* (Vol. 3).
- Mariau D. (1992). *Embrapa – Cirad/Irho. Mission entomologique*.
- Marrugan A. (2001). *Ecological diversity and its measurement*.
- Martínez et al. (2009). Identificación temprana y manejo integrado de la enfermedad pudrición del cogollo. *Palmas*, 30(2), 7.
- Martínez L. Torres L. . (2007). Presencia de la Pudrición de Cogollo de la palma de aceite (PC) en plantas de vivero. 28(4), 12-13.
- Martínez, López Gerardo; Torres L. Gabriel Andrés. (2007). *Presencia de la Pudrición de Cogollo de la palma de aceite (PC) en plantas de vivero* (Vol. 28). (Palmas, Ed.)
- Martins, E.S.H. (1990). *Contribulcao a oconhecimento sobre "Pudrición de cogollo" PC de la palma africana en Colombia*. EMBRAPA, Brasilia, D.F.
- Melgarjo et al. (2010). *Patógenos de plantas descritos en España*. Recuperado el 03 de marzo de 2014, de http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos_final_tcm7-1286.pdf
- Melo & Vargas. (2010). *Evaluación ecológica y silvicultural de ecosistemas boscosos*. Recuperado el 20 de mayo de 2014, de http://www.ut.edu.co/academico/images/archivos/Fac_Forestal/Documentos/LIBROS/evaluacion%20de%20ecosistemas%20boscosos%20%20Rafael%20vargas%20y%20Omar%20mel.pdf
- Meunier J. (1991). *Una posible solución genética para el control de la Pudrición de Cogollo en la Palma Aceitera*. Recuperado el 17 de noviembre de 2013, de <http://www.publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/download/.../284>
- Moorman. (2012). *Estudios de Pythium*. Recuperado el 10 de marzo de 2014, de <http://extension.psu.edu/pests/plant-diseases/all-fact-sheets/pythium>

- Newman et al. (2003). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Estados Unidos. Obtenido de <http://foros.monografias.com/archive/index.php/t-38141.html>
- Nieto P. (1996). Síntomas e identificación del agente causal del complejo Pudrición del Cogollo de la palma de aceite, *Elaeis guineensis* Jacq. Síntomas e identificación del agente causal del complejo Pudrición del Cogollo de la palma de aceite, *Elaeis guineensis* Jacq. 71(2), 57-60.
- Pérez et al. (2012). *First report in cuba of green point gall of cocoa cushion caused by albonectria rigidiuscula (fusarium decemcellulare)*. Recuperado el 03 de marzo de 2014, de <http://www.inisav.cu/fitosanidad/2012/16%281%2912.pdf>
- Petersohn et al. (2001). Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis* Journal of Bacteriology. 5617-5631.
- Pielou E. (1969). *An Introduction to Mathematical Ecology*. Wiley Interscience. New York, EE.UU. Obtenido de <http://rev-inv-ope.univ-paris1.fr/files/26205/IO-26205-9.pdf>
- Pla L. (2006). *Biodiversidad: inferencia basada en el índice de shannon y la riqueza*. Recuperado el 03 de marzo de 2014
- Renard J. (1991). Pudrición de cogollo en el Ecuador. 12(2), 31.
- Rojas A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general*. Recuperado el 05 de julio de 2013, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>
- Ronquillo, M. (2012). *Etiología de la pudrición del cogollo de la palma aceitera (Elaeis guineensis Jacq.) en el Ecuador*. Recuperado el 27 de mayo de 2012, de <http://dspace.senescyt.gob.ec/bitstream/28000/233/1/T-SENESCYT-0001.pdf>
- Sánchez et al. (2003). *Pantoea agglomerans y Sphingomonas paucimobilis en la bacteriosis del palmito de pejibaye (Bactris gasipaes K): un estudio ultraestructural*. Recuperado el 28 de febrero de 2014, de http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a01-8385_memoria.pdf
- Santos A. (2010). *Análisis de las últimas investigaciones sobre pudrición del cogollo en palma de aceite*. Recuperado el 27 de mayo de 2012, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/2724/1/796069.2010.pdf>

- Sharma M. (1999). utilization of Nigerian PS1 y PS2 Selection in Oil palm breeding programmes at uP bhd. *Proceedings of the seminar on PS1 and PS2 oil palm planting materials. Palm Oil.*
- Soldevilla C. (1995). Marras de origen fúngico (Damping-off) en plantas del género Pinus sp. cultivadas en invernadero. *21*, 87-109.
- Stephens C. (1998). Bacterial sporulation: A question of commitment? *Current Biology.* (8), 45-48.
- Suslow T. (1982). Aplicación de un método rápido para la diferenciación de bacterias patógenas y saprofitas sin tinción. *Phytopathology.* 72, 917-918.
- Swinburne T. (1993). Fatal yellows bud rot and spear rot of African oil palm. A comparison of the symptoms of these diseases in Brazil, Ecuador and Columbia. *69(89)*, 15-23.
- Uzunova-Doneva. (2004-2005). Anabiosis and Conservation of Microorganisms. *4*, 17-28.
- Vargas J. (2009). *Metodología para calcular el índice de diversidad acuática/biológica. caso de estudio.* Recuperado el 27 de marzo de 2014, de http://www.udc.es/dep/bave/jfreire/pdf_conservacion/2_Biodiversidad%20%281%29.pdf
- Vargas, M. (1992). *Fusarium Solani. Agente causal del complejo pudrición del cogollo?* Recuperado el 28 de marzo de 2014, de publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/viewFile/.../375
- Waites et al. (2001). *Industrial Microbiology, an Introduction.* 288.
- Zeng et al. (2013). *The Fusarium species isolated from banana and their phylogenetic relationships.* Recuperado el 30 de marzo de 2014, de [The%2bFusarium%2bspecies%2bisolated%2bfrom%2bbanana%2band%2btheir%2bphylogenetic%2brelationships.pdf](http://www.fusarium.org/~/media/Files/Publications/The%2bFusarium%2bspecies%2bisolated%2bfrom%2bbanana%2band%2btheir%2bphylogenetic%2brelationships.pdf)
- Zucker et al. (1972). Factors governing pectate lyase synthesis in soft rot and non-soft rot bacteria. *2*, 59-67.

