

**Etiología de la pudrición del cogollo de la palma aceitera
(*Elaeis guineensis* Jacq.) en el Ecuador**

Por

Mayra Patricia Ronquillo Narváez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

PROTECCIÓN DE CULTIVOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por:

Consuelo Estévez de Jensen, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

José Carlos Verle Rodrigues, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Ricardo J. Goenaga, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Matías J. Cafaro, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Skip Van Bloem, Ph.D.
Director de Departamento

Fecha

ABSTRACT

Oil palm bud rot is an important disease affecting the oil palm industry in Ecuador. The disease causes yellowing and drying of young leaves, bud rot and yellowing of unopened leaves and even death of the palm when the rot reaches the meristematic tissues. During June 2011 a survey was conducted in seven oil palm plantations: Aiquisa, Kayalú, Palesema, Palpailón, Palmeras de los Andes, Alespalma and Tabuche, located in San Lorenzo and Quinindé, in the province of Esmeraldas-Ecuador. Diseased tissue was isolated from bud, leaves, meristem tip and roots in different culture media: acidified potato dextrose agar (APDA); corn meal agar amended with: piramicin, ampicillin, rifampicin, and pentachloronitrobenzene (PARP); and nutrient agar (AN) for bacteria. Soil samples were collected for analyses of chemical properties. Roots were isolated for *Phytophthora* spp. and DAS-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) was carried out. Immunoblot and DAS-ELISA serological tests were used to identify *Erwinia*. Pathogenicity tests were carried out in the Research Center for Oil Palm (CIPAL) in Ecuador to evaluate the fungi and bacterial isolates. Two varieties: CIRAD code 2505 and the unspecific hybrid O x G, considered susceptible and tolerant cultivars respectively, were used for the experiment. Thirteen isolates of *Fusarium* spp. (10^7 UFC) and four isolates of *Erwinia* spp. (10^5 CFU) used for inoculation. *Fusarium* species represented a 36.59% of the isolates, *F. oxysporum* and *F. solani* the most important. *Phytophthora* was not isolated in the PARP culture and was not detected by DAS-ELISA however, the serological strip detected positive in two samples for *Phytophthora* spp. The morphological, biochemical, serological and molecular tests indicated that the bacterial isolates 10, 11, 16, and 19 corresponded to the genus *Erwinia*. In the pathogenicity tests, *F. oxysporum* and *F. solani* caused necrotic lesions in the youngest leaves of CIRAD 2504 without causing death of the plant. *F. oxysporum* caused smaller necrotic lesions in younger leaves of the O x G hybrid in comparison with CIRAD 2504. The inoculation of the bacterial isolates en nursery oil palms did not showed any symptom. The analysis of soil chemical properties showed a positive, low correlation between disease severity and the content of phosphate (P), copper (Cu) and iron (Fe) in the soil, suggesting a low association. The correlation coefficients were: P

(0.33), Cu (0.32) and Fe (0.39). Inoculation test with *F. oxysporum* and *F. solani* in two months-old oil palm plants, resulted in necrotic lesions and descendant rotting of the youngest leaf.

RESUMEN

La pudrición del cogollo (PC), en una enfermedad que ha afectado la industria de palma aceitera en Ecuador. La enfermedad se caracteriza por el amarillamiento de las hojas jóvenes o cogollo de la palma, acompañado de pudrición y secamiento de la flecha (hoja sin abrir) que causa la muerte de la palma si la pudrición alcanza los tejidos meristemáticos. En el mes de junio del 2011 se realizó un muestreo en siete plantaciones: Aiquisa, Kayalú, Palesema, Palpailón, Palmeras de los Andes, Alespalma y Tabuche, ubicadas en San Lorenzo y Quinindé en la Provincia de Esmeraldas, Ecuador. Desde cuatro secciones de palmas sintomáticas: cogollo, flecha, meristemo apical y raíces, se realizaron aislados en medios de cultivo de papa dextrosa agar acidulado (APDA), agar maíz con pimaricina, ampicilina, rifampicina y pentacloronitrobenzeno (PARP) y agar nutritivo (AN) para bacterias. Además, se colectó muestras de suelo para el análisis de las propiedades químicas. Desde tejido de raíz se realizó detección de *Phytophthora* con una tira serológica y con DAS-ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). Se realizaron pruebas de serología incluyendo inmunoblot y DAS-ELISA para identificar especies de *Erwinia*. Las especies de *Fusarium* representaron un 36.59% de los aislados, predominando *F. oxysporum* y *F. solani*. No se aisló a *Phytophthora* en medio de cultivo PARP ni fue detectada mediante el DAS-ELISA. En dos muestras de tejido se detectó *Phytophthora* spp. mediante una tira serológica. Las pruebas morfológicas, bioquímicas, de serología y moleculares, indican que los aislados bacterianos 10, 11, 16 y 19 correspondieron al género *Erwinia*. Para evaluar la patogenicidad de los aislados obtenidos se realizaron Postulados de Koch en el Centro de Investigaciones de Palma Aceitera (CIPAL) en Ecuador. Se utilizó palma aceitera CIRAD 2504 y el híbrido inespecífico OxG, consideradas como material susceptible y material tolerante a la enfermedad respectivamente. Se inocularon trece aislados de *Fusarium* spp. (10^7 UFC) y cuatro aislados de *Erwinia* spp. (10^5 CFU). En las pruebas de patogenicidad *F. oxysporum* y *F. solani* causaron lesiones necróticas en la hoja más joven de palmas CIRAD 2504, sin llegar a causar la muerte de la palma. *F. oxysporum* causó lesiones necróticas más pequeñas en la hoja más joven del híbrido inespecífico OxG en comparación con el material CIRAD 2504. La inoculación de los aislados bacterianos en palmas de vivero no mostró síntomas. El análisis de la correlación entre las propiedades químicas del suelo y la severidad de la enfermedad fue significativo para la

concentración de fósforo (P), cobre (Cu) y hierro (Fe) en el suelo. Los coeficientes de correlación fueron: P (0.33), Cu (0.34) y Fe (0.39), sugiriendo una baja asociación. En esta investigación la inoculación de *F. oxysporum* y *F. solani* en plantas de palma aceitera de dos meses de edad causó lesiones necróticas y pudrición descendente de la hoja más joven.

*A mi esposo Diego Francisco, amor de mi
vida, mi apoyo incondicional.*
*A mi hijo Martín Ignacio, regalito de Dios,
mi fuente de inspiración.*
*A mis padres: Irma y Manuel, por su
infinito amor, apoyo y dedicación.*
*A mis hermanos: Ricardo y Estefany,
por todo su cariño.*
¡Mi familia, la esencia de mi vida!

AGRADECIMIENTOS

A mi Padre Celestial, por llenarme de bendiciones, haciendo de mi vida una hermosa realidad.

A la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador SENESCYT, por la beca otorgada para cursar mis estudios de maestría en la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

A la Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera del Ecuador ANCUPA, al señor Presidente del período 2010-2012 Ing. Francisco Dávila por el patrocinio y financiamiento de la presente investigación.

Mi sincero agradecimiento al Ing. Rommel Vargas Camacho, por brindarme su confianza y por todo el apoyo para la consecución de mi beca.

Un especial agradecimiento a la Dra. Consuelo Estévez de Jensen, por aceptar dirigir este proyecto de investigación de vital importancia para el cultivo de la palma aceitera en el Ecuador, pero sobre todo por sus enseñanzas y el gran apoyo brindado.

A los miembros del Comité Graduado Dr. José Carlos Rodríguez y Dr. Ricardo Goenaga, gracias por sus recomendaciones y por la revisión del presente documento.

Expreso mi agradecimiento a los miembros del Departamento de Investigaciones de ANCUPA y a su director Dr. Gustavo Bernal, por la valiosa colaboración en varias etapas de esta investigación.

Al Ing. Roberto Burgos Cedeño, por brindarme su amistad y por iniciarme en el mundo de la palma aceitera.

Al personal técnico y administrativo de las plantaciones de palma aceitera en la Provincia de Esmeraldas, por brindarnos todas las facilidades durante el proceso de muestreo.

A mis compañeros de Laboratorio en la Estación Experimental de Juana Díaz: Margarita Marroquín, Gabriela Romero, Carlos Bolaños y Héctor Santiago, muchas gracias por su guía y colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE APÉNDICES.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Características generales de la palma aceitera.....	4
2.2. Descripción botánica.....	4
2.3. Principales enfermedades de la palma aceitera.....	6
2.3.1. Anillo rojo.....	6
2.3.2. Marchitez letal.....	7
2.4. Pudrición de Cogollo (PC).....	9
2.4.1. Síntomas.....	9
2.5. Microorganismos asociados a la PC.....	10
2.5.1. El género <i>Fusarium</i>	11
2.5.1.1. Clasificación taxonómica.....	11
2.5.1.2. Características morfológicas.....	11
2.5.2. <i>Phytophthora palmivora</i>	12
2.5.2.1. Clasificación taxonómica.....	13
2.5.2.2. Características morfológicas.....	13
2.5.3. Bacterias del género <i>Erwinia</i>	14
2.5.3.1. Clasificación taxonómica.....	15
2.5.3.2. Clasificación morfológica.....	15
2.6. Manejo de la enfermedad.....	16
2.7. El suelo y la nutrición en la incidencia de la PC.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Ubicación geográfica.....	19
3.2. Recolección de muestras de palma y suelo.....	20
3.3. Aislamiento de microorganismos asociados a la PC.....	21

3.3.1.	Aislamiento de hongos.....	21
3.3.2.	Aislamiento de chromistas.....	22
3.3.3.	Aislamiento de bacterias.....	22
3.4.	Identificación morfológica de hongos.....	23
3.5.	Pruebas bioquímicas y de crecimiento para bacterias.....	24
3.5.1.	Tinción Gram.....	24
3.5.2.	Crecimiento a 37 °C.....	24
3.5.3.	Fluorescencia en King B.....	24
3.5.4.	Prueba de la oxidasa.....	25
3.5.5.	Formación de pigmentos en YDC.....	25
3.5.6.	Prueba de pectatos.....	25
3.5.7.	Prueba de hipersensibilidad en plantas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)....	26
3.5.8.	Producción de ácidos a partir de carbohidratos.....	26
3.6.	Pruebas de serología.....	26
3.6.1.	Tira serológica (ImmunoStrip®) para la detección de <i>Phytophthora</i> spp.....	26
3.6.2.	ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas para la detección de <i>Phytophthora</i> spp.....	27
3.6.3.	Inmunoblot para la detección de <i>Erwinia carotovora</i>	28
3.6.4.	ELISA para la detección de <i>Erwinia amylovora</i>	28
3.7.	Identificación molecular.....	29
3.7.1.	Extracción de ADN de hongos y amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	29
3.7.2.	Extracción de ADN de bacterias y amplificación por PCR.....	30
3.7.3.	Purificación de productos de PCR.....	31
3.7.4.	Análisis de la secuencia de la región ITS y 16 S del ADN ribosomal.....	31
3.8.	Pruebas de patogenicidad.....	32
3.8.1.	Ensayo de patogenicidad con hongos y bacterias.....	32
3.8.2.	Reaislamiento de patógenos.....	33
3.8.3.	Análisis estadístico.....	34

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1. Microorganismos asociados a la PC.....	43
4.2. Identificación morfológica y molecular del género <i>Fusarium</i>	46
4.2.1. Identificación morfológica de <i>Fusarium</i> spp.....	47
4.2.1.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	47
4.2.1.2. <i>Fusarium solani</i>	48
4.2.2. Identificación molecular de <i>Fusarium</i> spp.....	49
4.3. Identificación serológica del género <i>Phytophthora</i>	51
4.4. Identificación de aislados bacterianos.....	53
4.4.1. Pruebas bioquímicas y de crecimiento.....	53
4.4.2. Pruebas de serología para el género <i>Erwinia</i>	55
4.4.3. Reacción de hipersensibilidad de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	57
4.4.4. Producción de ácidos a partir de carbohidratos.....	58
4.4.5. Identificación molecular de aislados bacterianos.....	59
4.5. Ensayo de patogenicidad con <i>Erwinia carotovora</i> y <i>E. amylovora</i>	60
4.6. Ensayo de patogenicidad con <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	62
4.7. Reaislamiento de <i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i> desde plantas inoculadas.....	68
4.8. Propiedades del suelo y la severidad de la PC.....	70
5. CONCLUSIONES.....	75
6. RECOMENDACIONES.....	76
7. REFERENCIAS.....	77
8. APÉNDICES.....	82

LISTA DE TABLAS

Tablas	Páginas
Tabla 1. Ubicación geográfica de plantaciones comerciales de palma aceitera visitadas.....	19
Tabla 2. Escala de severidad utilizada para el muestreo de palma aceitera con PC.....	21
Tabla 3. Aislamientos bacterianos inoculados en el ensayo de patogenicidad en palmas de vivero.....	32
Tabla 4. Pruebas de patogenicidad en palmas de vivero con diferentes aislados de <i>Fusarium</i>	33
Tabla 5. Muestras colectadas en las siete plantaciones de palma aceitera en la Provincia de Esmeraldas.....	36
Tabla 6. Frecuencia de aparición de hongos aislados desde tejido con PC en plantaciones de palma aceitera en la Provincia de Esmeraldas.....	45
Tabla 7. Frecuencia de bacterias aisladas desde tejido con síntomas de PC en la Provincia de Esmeraldas.....	45
Tabla 8. Origen e identificación taxonómica de los aislamientos de <i>Fusarium</i> , obtenidos desde flecha y bases peciolares en palma aceitera con PC.....	46
Tabla 9. Identificación molecular de especies de <i>Fusarium</i> aislados desde tejido de palma aceitera con PC, utilizando la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal y el programa BLAST.....	51

Tabla 10. Detección de <i>Phytophthora</i> sp. con DAS-ELISA y la tira serológica (ImmunoStrip® Test, Agdia, Inc.).....	52
Tabla 11. Características de los aislados bacterianos obtenidos en palma aceitera con síntomas de PC.....	55
Tabla 12. Resultados DAS-ELISA para la identificación de <i>Erwinia amylovora</i> e Inmunoblot para la identificación de <i>Erwinia carotovora</i>	56
Tabla 13. Resultados de la prueba de reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco con nueve aislados bacterianos.....	57
Tabla 14. Número de plantas inoculadas con <i>Erwinia amylovora</i> y <i>E. carotovora</i> con y sin síntomas.....	61
Tabla 15. Promedio de la severidad luego de la inoculación de <i>Fusarium</i> spp. en material susceptible CIRAD código 2504.....	63
Tabla 16. Promedio de la severidad luego de la inoculación de <i>Fusarium</i> spp. en material híbrido interespecífico O x G.....	67
Tabla 17. Resultados de análisis de las propiedades químicas del suelo en palmas con distintos grados de severidad.....	71
Tabla 18. Coeficientes de correlación de la severidad y el contenido de nutrientes en el suelo.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
Figura 1. Los casos de infección de PC en plantaciones de palma aceitera localizadas en suelos con un contenido alto y bajo de arcilla en Colombia (Acosta y Múnevar, 2005).....	18
Figura 2. Ubicación geográfica de las plantaciones de palma aceitera muestreadas en el Cantón San Lorenzo de la Provincia de Esmeraldas, Ecuador.....	20
Figura 3. Sintomatología interna y externa de palmas con PC en la plantación Aiquisa. A) Amarillamiento del cogollo; B) Lesiones necróticas en tejido de la flecha; D) Pudrición de la flecha; E) Pudrición del meristemo apical.....	38
Figura 4. Sintomatología interna y externa de palmas con PC en la plantación Kayalú. A) Amarillamiento del cogollo; B) Fibras negras en la base del estipe; C) Ausencia de raíces cuaternarias.....	39
Figura 5. Palmas de vivero en la plantación PDA. A) Sistema radicular escaso en planta sintomática; B) Sistema radicular abundante en palma asintomática; C) Amarillamiento de hojas y pudrición de la hoja más joven.....	40
Figura 6. Sintomatología de palmas híbridas con PC en la plantación Palesema. A) Pudrición de la flecha; B) Amarillamiento del cogollo; C) Bordes cloróticos en folíolos.....	40
Figura 7. Sintomatología interna y externa de PC en la plantación Alespalma. A) Amarillamiento del cogollo; B) Pudrición descendente que avanza al meristemo; C) Sistema de raíces absorbentes escaso.....	41

Figura 8. Sintomatología interna y externa de PC en la plantación Palpailón. A) Amarillamiento del cogollo; B) Pudrición de la flecha; C) Ausencia de pudrición descendente.....	42
Figura 9. Sintomatología interna y externa de PC en la plantación Tabuche. A) Amarillamiento del cogollo; B) Pudrición de la flecha con doblamiento; C) Maceración de tejidos meristemáticos.....	43
Figura 10. A) Cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio APDA; B) Microconidias; C) Macroconidias y microconidias y C) Clamidosporas. B, C y C. Microscopio en contraste de fase, lente 40x.....	48
Figura 11. A) Cultivo de <i>Fusarium solani</i> en medio APDA; B) Microconidias; C y D) Macroconidias y microconidias. B, C y D. Microscopio en contraste de fase, lente 40x.....	49
Figura 12. Gel de agarosa al 1% con productos de amplificación de la región ITS de 500 pb. Carril 1: marcador 1 kb. Carril 2-10 aislados de <i>Fusarium</i> (41, 54, 50, 89, 90, 42, 12, 84 y 70). Carril 11 y 12 control negativo y positivo.....	50
Figura 13. Tinción Gram de aislados bacterianos 11 y 27.....	54
Figura 14. Prueba de la oxidasa. A) Resultado negativo, reacción de color amarillo; B) Resultado positivo, reacción de color púrpura.....	54
Figura 15. Resultados de las pruebas de serología realizadas a los aislados de <i>E. amylovora</i> y <i>E. carotovora</i> . A) DAS ELISA para <i>E. amylovora</i> y B) Inmunoblot para <i>E. carotovora</i>	56
Figura 16. Reacción de hipersensibilidad a las 48 horas después de la inoculación de aislados de <i>Erwinia</i> spp. A) Punto de inoculación; B) y C) Necrosis en el punto de inoculación con los aislados 11 y 16.....	58

Figura 17. Medio C de Dye con seis fuentes de cargohidratos. No se observó producción de ácidos con los aislados bacterianos 10, 11, 16 y 19.....59

Figura 18. Gel de agarosa al 1% con productos de la amplificación de la región 16S de ARN ribosomal de 500 pb de *Fusarium* spp. Carril. Carril 1: marcador 1 kb. Carril 2-5 aislados bacterianos 10, 19, 16 y 11. Carril 6 y 7 control negativo y positivo.....60

Figura 19. Plantas inoculadas con el aislado 10 de *E. carotovora*. A) Sin síntomas visibles; B) Lesiones causadas por la herida al momento de la inoculación.....61

Figura 20. Pruebas de patogenicidad con el aislado 70 de *F. oxysporum* en palmas CIRAD código 2504. A y B) Necrosis en la hoja más joven después de 4 días de la inoculación; C y D) Pudrición descendente de la hoja más joven después de 27 días de la inoculación.....64

Figura 21. Pruebas de patogenicidad con el aislado 12 de *F. solani* en palmas CIRAD código 2504. A) Necrosis en la hoja más joven después de 4 días de la inoculación; B) Pudrición descendente de la hoja mas joven después de 27 días de la inoculación.....65

Figura 22. Pruebas de patogenicidad con los aislados 70 y 12 de *F. oxysprum* y *F. solani* en palmas CIRAD código 2504, necrosis de la hoja más joven 4 días después de la inoculación. A) Inoculación con los aislados 8+9 de *Fusarium* sp. y *F. oxysporum*; B) Inoculación con los aislados 1+9 de *F. solani* y *F. oxysporum*..... 66

Figura 23. Pruebas de patogenicidad con el aislado 70 de *F. oxysporum* en material tolerante “híbrido”. A) Necrosis en la hoja más joven después de 4 días de la inoculación; B) Pudrición descendente de la hoja mas joven después de 27 días de la inoculación.....68

Figura 24. Reaislamiento en medio APDA de *F. oxysporum* y *F. solani*. A) Crecimiento de *F. oxysporum* desde tejido inoculado; B) Crecimiento de *F. solani* desde tejido inoculado; C) Macroconidias de *F. oxysporum* y D) Macroconidias y microconidias de *F. solani*.....69

Figura 25. Gel de agarosa al 1% de *F. oxysporum* y *F. solani* aislado desde tejido inoculado en palmas de vivero. Carril 1: marcador 1kb; Carril 3: aislado 9 de *F. oxysporum*; Carril 5: aislado 1 de *F. solani*; Carril 7 y 8: Control negativo y positivo.....70

LISTA DE APÉNDICES

Apéndices	Páginas
APÉNDICE 1	
Medio papa dextrosa agar acidulado, APDA (Martin, 1992).....	82
APÉNDICE 2	
Medio maíz agar modificado PARP (Kanwischer and Mitchell 1978).....	82
APÉNDICE 3	
Medio agar nutritivo (AN) (Schaad et al., 2001).....	83
APÉNDICE 4	
Medio extracto de levadura, carbonato de calcio, glucosa (YDC) (Schaad et al., 2001).....	83
APÉNDICE 5	
Medio agar suave (Schaad et al., 2001).....	84
APÉNDICE 6	
Medio King B (Schaad et al., 2001).....	84
APÉNDICE 7	
Medio CVP (Schaad et al., 2001).....	85
APÉNDICE 8	
Medio C de Dye (Schaad et al., 2001).....	85
APÉNDICE 9	
Medidas que 20 conidias de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Fusarium solani</i>	86

APÉNDICE 10

Ensayo de formación de ácidos a partir de carbohidratos para aislados de *Erwinia*.....87

APÉNDICE 11

Análisis de las propiedades químicas del suelo en seis palmas muestreadas en la Plantación Aiquisa.....88

APÉNDICE 12

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Kayalú.....90

APÉNDICE 13

Análisis de las propiedades químicas del suelo en ocho palmas muestreadas en la Plantación Palmeras de los Andes.....92

APÉNDICE 14

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Alespalma.....94

APÉNDICE 15

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cinco palmas muestreadas en la Plantación Palesema.....96

APÉNDICE 16

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Palpailón.....98

APÉNDICE 17

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Tabuche.....100

1. INTRODUCCIÓN

La palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) originaria de África Occidental, es un vegetal perenne (Corley y Tinker, 2009). Cuando se cultiva con propósitos comerciales, tiene en promedio una vida útil entre 24 y 28 años, de acuerdo con el tipo de material sembrado. Durante este lapso, cada palma emite racimos de frutos oleaginosos, que pueden alcanzar producciones de 4.2 toneladas durante su vida productiva. Esto representa unas 600 toneladas acumuladas de fruta por hectárea, cuando el proceso productivo se desarrolla en condiciones óptimas de suelo, clima, nutrición, mantenimiento, sanidad y administración (Bernal, 2001).

De los frutos se extrae dos tipos de aceite: uno que se sustrae de la pulpa, el aceite de palma, y otro de la almendra, conocido como aceite de palmiste. En la fase industrial del cultivo se refinan y se fraccionan los aceites, para producir las oleínas y las estearinas de palma y de palmiste (Bernal, 2001). El aceite de palma es una materia prima importante y versátil tanto para la industria alimentaria y no alimentaria. El consumo de aceites vegetales como la colza, la soja y el aceite de palma se ha incrementado más que cualquier otro alimento durante los últimos 30 años (Clay, 2004).

La palma aceitera se encuentra entre los cultivos oleaginosos con rendimientos elevados por hectárea. Este hecho ha contribuido al desarrollo de una industria que se expande rápidamente en las tres áreas cultivadas de zonas ecuatoriales o intertropicales: África, Asia Suroriental y América del Sur y Central (Corley y Tinker, 2009).

En la actualidad Asia Suroriental se ha convertido en el mayor productor de aceite de palma. Los aumentos más significativos de la producción durante los últimos siete años se han dado en Malasia (8.5% por año), e Indonesia (16.9% por año), entre las dos representan el 80% de la producción mundial (Fairhurst y Hårdter, 2012).

La palma aceitera es un cultivo muy importante en América Central y América del Sur y se anticipa una considerable expansión para los próximos 20 años. El área más grande se

encuentra en Colombia (29%) donde la mayoría de la superficie plantada se encuentra en los Llanos Orientales, al este de los Andes. Las segundas y terceras áreas más grandes, se encuentran en Ecuador (24%) y Honduras (12%) respectivamente (Fairhurst y Härdter, 2012).

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.

La “pudrición del cogollo”, la “marchitez letal” y el “anillo rojo”, son las principales enfermedades en las plantaciones de palma aceitera en América Latina, y constituyen una limitante para el desarrollo del cultivo. La pudrición del cogollo se caracteriza por pudriciones y secamientos de tejidos en el cogollo de la palma, acompañado del amarillamiento de las hojas jóvenes y causa la muerte de la palma si alcanza los tejidos meristemáticos. Estas enfermedades han destruido plantaciones enteras en Panamá, Colombia, Surinam, Brasil y Ecuador, constituyen una limitante al desarrollo del cultivo de la palma aceitera en América Latina (Franqueville, 2001).

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

De acuerdo con Elliott (2009), en Ecuador se han observado tres tipos de síntomas. En el Cantón San Lorenzo y la Amazonía se distingue dos tipos: 1) Clásica, afecta rápidamente el cogollo de la palma y descompone el meristemo apical, 2) Crónica, la enfermedad no se propaga

con rapidez al cogollo, esto se traduce en un descenso lento y la muerte económica de la palma, 3) De recuperación, se observa en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas es similar a la crónica, excepto porque no inhibe permanentemente la división celular en el meristemo apical, lo que permite la producción de nuevas hojas y flores.

La etiología de la pudrición de cogollo no ha sido estudiada con éxito en el Ecuador y es indispensable determinar él o los agentes causales para lograr establecer medidas de control. La presencia de múltiples síntomas, la asociación de diferentes patógenos y la falta de estudios de factores edáficos que puedan contribuir a la predisposición de la planta al ataque de patógenos han contribuido al fracaso en la caracterización de esta enfermedad.

Los objetivos de la presente investigación fueron:

1. Realizar un muestreo de tejido con síntomas de pudrición de cogollo en plantaciones de palma aceitera de las Provincias de Esmeraldas.
2. Identificar con análisis morfológico y molecular hongos y bacterias asociados a la pudrición del cogollo.
3. Realizar pruebas de patogenicidad de los principales hongos y bacterias aislados desde tejido de palma con síntomas de pudrición del cogollo.
4. Determinar factores edáficos que puedan contribuir al desarrollo de la enfermedad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Características generales de la palma de aceite

Botánicamente la palma de aceite se conoce con el nombre de *Elaeis guineensis*. Nombre dado por Jacquin en 1763, con base en la palabra griega *elaion*, que significa aceite y *guineensis*, hace honor a la región de Guinea de donde se considera originaria. La palma de aceite es un cultivo tropical, tanto en su origen como en su expansión y desarrollo a lo largo de siglos, su mejor adaptación se encuentra en la franja ecuatorial, entre 15 grados de latitud norte y sur, donde las condiciones ambientales son más estables. La posición geográfica de Ecuador se considera privilegiada. La mejor gama de temperaturas parece ser 24 a 28 °C, aunque pueden crecer palmas a mayor altura o en el límite geográfico alrededor de 15 N, con temperaturas mínimas de 20 °C durante parte del año. Los requerimientos de agua en el cultivo de palma de aceite oscilan entre 1800 y 2200 milímetros bien distribuidos a lo largo del año. La palma de aceite es una planta beneficiada por altas intensidades de luz. La duración de la insolación es un factor importante, en la producción de la palma de aceite, necesita unas 1500 horas de sol bien distribuidas durante el año para asegurar una buena maduración de los racimos. Suelos francos a franco arcilloso, sueltos, profundos, bien drenados y de origen aluvial o volcánicos, son los más deseables para el cultivo de palma de aceite. La palma de aceite se ha cultivado en muchas áreas que no parecen ser tan óptimas, una de las razones es que la palma se ha adaptado a un régimen climático de lluvia de verano y sequía de invierno (Corley y Tinker, 2009).

2.2. Descripción botánica

La palma de aceite perteneciente a la familia Arecaceae es una palma grande con un penacho de hojas y un solo tallo en forma de columna. Su apariencia característica "desordenada" en contraste con el cocotero (*Cocos nucifera*) se debe al ángulo irregular de inserción de los folíolos a lo largo del raquis de la hoja (Hartley, 1988).

Raíces, morfológicamente el sistema radicular comprende un extenso sistema fibroso y adventicio, que irradia desde la parte inferior prominente del tronco (alrededor de 0.8 m de diámetro), y que se extiende entre 0.4 y 0.5 m en el suelo en la base del tronco. La mayor parte de la biomasa de las raíces se encuentra dentro de 1 metro de la superficie del suelo, pero las raíces activas en la absorción de nutrientes se localizan en mayor grado en los 0.5 m superficiales (Fairhust y Härdter, 2012).

Tallo o Estipe, es una columna erecta y uniforme que puede alcanzar una altura de 25-30 m, en su parte central alberga el punto de crecimiento o meristemo apical. Las palmas crecen en promedio de 30 a 60 cm por año (Corley y Tinker, 2009; Fairhust y Härdter, 2012).

Hojas, miden de 7-8 m de largo, en condiciones normales las palmas adultas tienen entre 30 y 49 hojas funcionales. Comprende los siguientes componentes: El peciolo, mide 1.15 m de largo y corresponde a la parte de la hoja entre el tronco y el punto de inserción del primer foliolo verdadero y esta provisto de espinas. Luego está el raquis que mide de 5-6 m de largo, es asimétrico transversalmente, proporciona sostén a los folíolos insertos en las caras laterales. Finalmente, los folíolos (hojas pinnadas) están insertados en dos hileras a cada lado del raquis. Cada hoja contiene alrededor de 150-250 folíolos, cada uno con una nervadura central y una lamina. Los folíolos miden de 3-5 dm de ancho en el punto medio y 80-120 cm de largo (Fairhust y Härdter, 2012).

Inflorescencias, cada hoja que produce la palma trae en su axila una inflorescencia sin sexo definido. Por su condición de monoica, la palma de aceite produce separadamente flores masculinas y femeninas sobre el mismo árbol. Las flores masculinas, proveen polen, están compuestas de 100 a 160 espigas, cada una de ellas tiene entre 10 y 20 cm de largo y de 700 a 1200 flores, que en conjunto proveen entre 30 y 60 gramos de polen. Las flores femeninas, también insertadas en espiguillas y dispuestas en espiral alrededor del raquis o pinzote, pueden estar distribuidas hasta 110 espigas y alcanzar la cantidad de 4000 flores aptas para ser polinizadas (Corley y Tinker, 2009).

Frutos, es una drupa sésil o una semilla encerrada en una pulpa carnosa de forma variada casi esférica u ovoide, mide de 3 a 6 cm de largo y cuentan con un peso aproximado de 5 a 12 gramos. Tienen la piel lisa y brillante (exocarpio) de color amarillo anaranjado, una pulpa o tejido fibroso que contiene las células con aceite (mesocarpio), una nuez o semilla compuesta por un cuesco lignificado (endocarpio), y una almendra aceitosa o palmiste (Endospermo). Los frutos insertados en las espiguillas que rodean el raquis en forma helicoidal, conforman los racimos con peso variable entre 5 a 40 kg (Corley y Tinker, 2009; Fairhust y Härdter, 2012).

2.3. Principales enfermedades de la palma aceitera

Hasta la Segunda Guerra Mundial parece que la palma aceitera estaba en gran parte libre de enfermedades y plagas (Hartley, 1988. Citado por Corley y Tinker, 2009), pero conforme se expandió el cultivo, han habido brotes serios y devastadores de enfermedades en varias partes del mundo (Corley y Tinker, 2009). En varias partes de África la enfermedad de mayor importancia ha sido la marchitez causada por *Fusarium*, en Nigeria, la pudrición seca basal (*Ceratocystis*) ha causado considerables pérdidas. En Asia, *Ganoderma* es un problema en plantaciones replantadas (Corley y Tinker, 2009). Las tres enfermedades que son de particular importancia en América Central y América del Sur son la enfermedad del anillo rojo, la marchitez letal y la pudrición de cogollo (Fairhust y Härdter, 2012).

2.3.1. Anillo rojo

El anillo rojo/hoja pequeña es la enfermedad mas importante del cocotero y la palma aceitera en América Central (Chinchilla, 1997). Sin embargo, la enfermedad también se encuentra en Venezuela, Surinam, Brasil, Colombia y Ecuador, en donde está es muy extendida y ha causado considerable daño (Schuling y Dinther, 1982. Citado por Corley y Tinker, 2009).

En Ecuador, la presencia del anillo rojo es un problema nacional y no se tiene estadísticas de la enfermedad en el país. La enfermedad puede mantenerse a un bajo nivel en una plantación

si se sigue un enfoque integral en el manejo, que incluye la eliminación de plantas enfermas y la reducción de la población del vector (Chinchilla y Escobar, 2007).

La enfermedad del anillo rojo/hoja pequeña es causada por el nematodo del cocotero (*Rhadinaphelenchus cocophilus*). Entre los principales síntomas se observa un anillo cilíndrico marrón de 1-2 cm de ancho y 7-8 cm desde el brote del tronco. El anillo es más distintivo en la base de la palma. Cuando progresa la enfermedad se presenta enanismo de la corona de la palma que muestra un grupo de hojas e rectas, las hojas son onduladas y retorcidas que a veces se adhieren al raquis, se vuelven cloróticas y posteriormente se secan. El raquis se torna marrón claro con manchas amarillas y se observa podredumbre del racimo y falta de formación de frutos (Corley y Tinker, 2009). La diseminación del nematodo se realiza a través de los insectos *Rhynchophorus palmarum* y *Metamasius hemipterus* (Calvache et al., 1995).

La infección puede ser minimizada mediante la eliminación de las palmas afectadas, las que deben ser envenenadas, taladas y quemadas (Fairhurst y Härdter, 2012). La toma de medidas sanitarias regulares como: trapeo de vector con feromonas, minimizar las heridas al tronco por la poda de hojas a ras (Corley y Tinker, 2009). Se deben dejar bases de hojas (8-12 cm de longitud) adheridas al tronco de la palma después de la poda y la cosecha (Fairhurst y Härdter, 2012).

2.3.2. Marchitez letal

La marchitez letal (ML) es una enfermedad devastadora de la palma aceitera, se presenta en Colombia, Ecuador y Perú (Corley y Tinker, 2009). En Colombia la ML apareció en 1994 y es el problema potencial más grave de la palmicultura en la zona (López, 2010). En Ecuador, la mayor incidencia se observa en la zona ubicada entre los cantones Santo Domingo y La Concordia, se cree que unas 100 hectáreas de la zona pueden estar afectadas. Además se sospecha de la presencia de la enfermedad en el Oriente Ecuatoriano (ANCUPA 2012, com. pers.).

Hay evidencia de que la enfermedad es causada por el protozoo flagelado *Phytomonas staheli*. El vector mas probable es *Lincus lethifer* pero el minador de la raíz *Sagalassa valida*, y el insecto *Myndus crudus* también pueden desempeñar un papel como vectores de enfermedades (Fairhust y Härdter, 2012).

La ML presenta diferentes síntomas según la edad de la palma. Sin embargo, siempre presenta algunos síntomas característicos tanto en la parte externa como en la parte interna de la palma, los cuales son usados para el diagnóstico de la enfermedad en campo (Fajardo et al., 2005. Citado por Duarte, 2007).

Entre los síntomas externos característicos utilizados para el diagnóstico de palmas afectadas con ML se encuentra la súbita descomposición de los racimos en desarrollo, se observa una coloración rojiza de la parte superior de los peciolos y desecación de las hojas, a partir de las hojas más bajas. Además, se observa rayas de color marrón rojizo en el centro y en los extremos de los foliolos inferiores y cambios de color de hoja verde, a verde pálido, amarillento, rojizo-marrón y gris ceniza. Las palmas mueren después de 2-3 semanas y las raíces se pudren antes de la aparición de los síntomas externos (Fairhust y Härdter, 2012).

En palmas adultas de más de 7 años, la enfermedad presenta dos tipos de manifestación de sintomatología externa (marchitez letal rápida y marchitez letal lenta) que se determina por la velocidad en el deterioro de la palma (Duarte, 2007).

Se ha desarrollado estrategias para disminuir la incidencia de la enfermedad por medio de prácticas culturales, por ejemplo: inspección en campo de la enfermedad, erradicación de palmas sintomáticas, reducir la presencia de gramíneas mediante la combinación de insecticidas y herbicidas para eliminar las plantas hospedantes alternativas de los vectores (Cenipalma, 2007;) Corley y Tinker, 2009; Fairhust y Härdter, 2012).

2.4. Pudrición de cogollo (PC)

En los años 60 se manifestaron los primeros daños ocasionados por la PC en América Latina. En Ecuador, fue en 1976, en la hacienda "Palmeras de los Andes", en palmas de 3-4 años. En esta plantación el daño permaneció relativamente limitado, e incluso se registraron regularmente casos de recuperación (Dzido et al., 1978. Citado por de Franqueville, 2001).

En 1979, la PC se presentó en palmas de dos años en la vertiente amazónica y en 1992-1993 el ataque de la enfermedad fue devastador en "Palmeras del Ecuador" (mas de 5.000 ha) en Shushufindi y en Huashito (Palmoriente, también con más de 5.000 ha) Dzido et al., 1978. Citado por de Franqueville, 2001). Actualmente, San Lorenzo, Provincia de Esmeraldas, constituye el epicentro de la pudrición del cogollo.

2.4.1. Síntomas

De acuerdo con de Franqueville (2001), los primeros síntomas se expresan por una clorosis en las hojas jóvenes (cogollo). Se presentan pudriciones húmedas bajo los folíolos de las hojas de la hoja bandera (flecha), extendiéndose por contacto de un folíolo al otro. En la base de estas hojas aparece una deliquesencia de los tejidos que se extiende hasta los puntos de crecimiento. El mismo autor en el 2003, menciona que hay dos formas de PC: una forma letal, que es predominante en el Ecuador y la Amazonía Brasileña y en algunas zonas de Colombia y, una forma no letal con una tasa alta de recuperación de la palma que se encuentra principalmente en la zona oriental de Colombia. El crecimiento de la palma y el rendimiento se reducen en un periodo de 18-24 meses, se reemplaza la cubierta de la hoja con hojas sanas después de que los síntomas de la enfermedad han disminuido.

Elliott (2009) en su reporte de visita al Ecuador señala que se distingue tres tipos de PC: clásica, crónica y de recuperación, la principal diferencia es la tasa de desarrollo de la enfermedad y/o la capacidad de la palma para responder a la infección del potencial patógeno.

“*PC clásica*, la enfermedad afecta rápidamente el cogollo de la palma y descompone el meristemo apical, probablemente porque la palma no tiene tiempo para producir defensas contra el potencial patógeno o el medio ambiente es muy propicio para el desarrollo de la enfermedad”.

“*PC crónica*, la enfermedad no se propaga con rapidez al cogollo, tal vez porque la palma tiene tiempo de producir defensas contra el potencial patógeno o puede ser debido a que las condiciones climáticas no son propicias para el desarrollo de la enfermedad. La enfermedad sigue avanzando y en las hojas que estaban desarrollándose en el cogollo surgen los síntomas. El meristemo apical cesa de producir nuevas hojas diferenciadas, a pesar de que el meristemo apical físicamente no puede estar descompuesto. Esto se traduce en un descenso lento y la muerte económica de la palma (no hay producción)”.

PC de recuperación, esta enfermedad es similar a la PC crónica, excepto porque no inhibe permanentemente la división celular en el meristemo apical, lo que permite la producción de nuevas hojas y flores. Las nuevas hojas y flores a menudo son deformes, pero surgen hojas normales en apariencia y la palma empieza a producir frutos nuevamente. Las palmas afectadas se recuperan (desarrollo de inmunidad) (Elliott, 2009).

2.5. Microorganismos asociados a la PC

Existen registros de patógenos asociados a la PC desde 1928, cuando Reinking, citado por Richardson (1995), descubrió la existencia de bacterias, hongos del género *Fusarium* y una posible *Phytophthora*.

En plantaciones de palma de aceite de las zonas Occidental y Central de Colombia se estudiaron algunos hongos asociados a la PC como: *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Nigrospora* sp. Para el caso de bacterias, las más frecuentes fueron *Erwinia* sp. y *Pseudomonas*. Como cromistas se aislaron *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. (Sarria et al., 2008).

En Ecuador, en la plantación Palmeras del Ecuador (PDE) se estudió la microflora asociada a la PC de la palma de aceite y se encontraron principalmente hongos de los géneros: *Phoma*, *Cephalosporium*, *Pirenochaeta*, *Pestalotia* y *Colletotrichum* (Quillec, 1983. Citado por Sarria et al., 2008).

2.5.1. El género *Fusarium*

Existen registros previos de trabajos que mencionan a la PC, en ellos se considera su posible agente causal. Bachy (1954), citado por Sarria et al., (2008) encontró una asociación con *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. roseum*, pero la inoculación artificial de estos hongos no tuvo resultados definitivos sobre el agente causal de la enfermedad. En América Latina en 1976, Renard (citado por de Franqueville, 2001, 2003) realizó aislamientos de palmas afectadas con PC, mostrando el predominio de cepas de *Fusarium* (*F. oxysporum* y *F. solani*) y bacterias en el tejido afectado, las pruebas de inoculación no reprodujeron los síntomas de la enfermedad. El Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) informa a *Fusarium solani* como un hongo aislado con mayor recurrencia desde tejido afectado con la pudrición del cogollo (INIAP, 2011).

2.5.1.1. Clasificación taxonómica

Fusarium es un organismo Eucariota, Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Sordaryomycetes, Orden: Hypocreales, Familia: Nectriaceae, Subfamilia: Nectriaceae mitospóricos, Género: *Fusarium* (Crous et al., 2004).

2.5.1.2. Características morfológicas

Las especies de *Fusarium* son variables en su composición genética y el medio ambiente en el cual crecen causa cambios morfológicos. La base en la identificación de especies de *Fusarium* es la macroconidia (Toussoun et al., 1983). La macroconidia, tiene forma de media

luna o canoa y consta de una célula apical y una célula basal. Hay cuatro formas de células apicales: obtusa, papilada, gancho y elongada. La célula basal tiene cuatro formas: de pie, pie elongado, en forma de muesca y apenas muescado. La célula basal es la menos curvada de todas las células en la conidia, si esta es curvada el resto también. Los caracteres más importantes son los relacionados con la longitud y forma de la célula (Leslie and Summerell, 2006). No todas las especies de *Fusarium* producen microconidias, sin embargo es una importante característica. Son producidas en el micelio aéreo, nunca en esporoquios (Toussoun et al., 1983). Las células conidiogénicas en la cual se forman, y su disposición alrededor de la célula conidiogénica son importantes características en el diagnóstico. Por lo general tienen de 0 o 1 septo, algunas especies tienen dos septos. El pie microconidial puede ser de forma oval, reniforme, truncada, piriforme, globosa, napiforme, esférica y fusiforme (Leslie and Summerell, 2006).

Las clamidosporas, son una importante característica de muchas especies de *Fusarium* y no están bien conservadas evolutivamente. Las clamidosporas pueden estar formadas solas, dobles, en grupo o en cadenas y se forman en seis semanas y pueden producirse en poca cantidad. Se encuentran en micelio aéreo o embebidas en el agar, la ubicación es importante en la identificación de especies (Leslie and Summerell, 2006).

2.5.2. *Phytophthora palmivora*

La hipótesis de *Phytophthora* como causante de la PC, fue propuesta por Quillec en 1988, citado por de Franqueville (2001), en Shushufindi, Ecuador en 1986. El propósito del trabajo fue buscar los cromistas *Phytophthora* y *Pythium*, con el uso de medios de cultivo específicos o trampas en manzanas. La proporción muy baja de aislados condujo a concluir que estos oomicetos no intervienen en la pudrición del cogollo. Recientemente, se ha postulado que la lesión inicial de la PC es causada por *Phytophthora palmivora*, que infecta el tejido de la planta inmadura en la yema apical (Sarria et al., 2008).

En palmas de vivero, las lesiones pequeñas son visibles tres o cuatro días después de la infección inicial y, si las condiciones climáticas favorecen la infección, las hojas pueden estar

infectadas por el contacto físico. La infección penetra a través de la yema haciendo morir la próxima hoja emergente (Fairhurst y Hårdter, 2012). Ensayos con Fosetil Al (Aliette) o Metalaxil conducidos durante varios años han resultado infructuosos (Franqueville, 2001).

2.5.2.1. Clasificación taxonómica

Phytophthora pertenece al Reino: Chromista, Phylum: Oomycota, Clase: Oomycetes, Orden: Peronosporales, Familia: Pythiaceae (Crous *et al.*, 2004).

2.5.2.2. Características morfológicas

Phytophthora spp. posee hifas vegetativas, diploides, cenocíticas, con paredes celulares compuestas de celulosa y quitina. Produce una gran variedad de propágulos incluyendo clamidosporas, oosporas, esporangios y zoosporas (Ploetz, 2003).

Las oosporas son esporas sexuales que se forman de la fusión del anteridio con el oogonio. Las diferentes especies pueden clasificarse según la posición del anteridio con respecto al oogonio, el área que ocupa la oospora con respecto al oogonio (plerótico o applerótico) y las papilas de los esporangios. Algunas especies producen clamidosporas que son estructuras de supervivencia capaces de permanecer latentes en el suelo o en los tejidos de las plantas hasta encontrar condiciones favorables para su germinación (Donald y Ribeiro, 1996).

Las zoosporas son esporas asexuales producidas por los esporangios, los cuales poseen flagelos en la parte posterior y anterior que le permite nadar a través de los poros del suelo. Las condiciones de humedad en el suelo facilitan su movilidad y es por esto que los casos más severos de la enfermedad se presentan en suelos inundados o con un drenaje pobre. Las zoosporas son atraídas hacia la superficie radicular por quimiotaxis y electrotaxis, una vez las zoosporas llegan a la rizósfera se enquistan y comienzan a infectar el hospedero (Morris y Gow, 1993; Van West *et al.*, 2002; Ploetz, 2003).

Los esporangios son papilados con formas variables, ovoides, esféricos o elipsoides, con un tamaño de 35 a 60 μm en longitud y pedicelo corto menor a 5 μm de largo. Cada esporangio descarga de 10 a 40 zoosporas cuando son incubados en agua. Las clamidosporas son terminales intercaladas con un diámetro promedio de 33 μm .

Phytophthora palmivora, es heterotálica, forma oosporas ligeramente apeleróticas por los cruces de la forma A1 y A2. El oogonio y la oospora son esféricos, con un diámetro de 17 a 29 μm . El anteridio es anfígeno, con un diámetro de 12 a 16 μm . El mínimo de temperatura de crecimiento para esta especie es de 11°C, con una temperatura óptima de 27.5 a 30°C y un máximo de 35 °C (Donald y Ribeiro, 1996; Ploetz, 2003; Gallegly y Hong, 2008).

2.5.3. *Erwinia* spp.

En la zonas de Shushufindi y Huashito en 1995 (Allen et al., 1995, citado por Franqueville, 2001) encontraron analogías entre la PC y el fuego bacteriano de los árboles frutales (*Fire Blight of Pear and Apple*), causado por *Erwinia amylovora*. Sugiriendo que estas dos enfermedades tenían en común una dispersión que era visiblemente aérea asociada con abejas, en el caso del fuego bacteriano (Johnson y Stockwell, 1998. Citado por Franqueville, 2001). Sugieren, la presencia de una bacteria del género *Erwinia* que puede ser aislada de los tejidos tiernos en proceso de desarrollo y en los cogollos, y que las dos enfermedades eran influenciadas por los factores ambientales y el manejo culturales. Además, proponen que un aislado poco agresivo proveniente de un área silvestre, pudo ganar agresividad durante infecciones sucesivas, hasta adquirir mayor virulencia. *Erwinia* puede tener un hábitat en el suelo, o conservarse en los restos vegetales, y el inóculo llegando a ser altamente agresivo podría provocar daños precoces en el replantío (Franqueville, 2001).

Como en el caso del fuego bacteriano, la bacteria puede actuar emitiendo una toxina (el amylovorin). La enfermedad también es difícil de reproducirse en los árboles frutales, porque es necesario que sean reunidas condiciones climáticas, condición fisiológica de la planta, poblaciones de vectores para que haya expresión de los síntomas (Franqueville, 2001).

2.5.3.1. Clasificación taxonómica

La posición taxonómica, nomenclatura e interrelaciones de los miembros del género *Erwinia* ha sido sujeto de diversas propuestas (Schaad et al., 2001). La más amplia clasificación es la de Dye, sugiere que las especies de *Erwinia* pueden dividirse en cuatro grupos: “*amylovora*” (causante de marchitamientos no pectolíticos), “*carotovora*” (pudriciones blandas pectolíticas), “*herbícola*” (pigmento amarillo) y el grupo de *Erwinia* atípicas (Dye, 1981; Schaad et al., 2001). El género *Erwinia* pertenece al reino Bacteria, familia Enterobacteriaceae (Martinec y Kocur, 1964).

2.5.3.2. Características morfológicas

Erwinia amylovora, forma bacilos Gram negativos solos o en grupos (Martinec y Kocur, 1964). La morfología de la colonia depende en gran medida del medio y condiciones de crecimiento (Vanneste, 2000). Las colonias en agar nutriente con sacarosa al 5% suelen ser de color blanco, brillante, mucoso con estrías radiales y un anillo central después de 2 a 3 días de crecimiento a 27 °C (Dickey, 1984. Citado por Vanneste, 2000). No hay crecimiento anaeróbico, hidrolizan esculina, todas las cepas producen ácido a partir de sorbitol. Las cepas crecen en fuentes de carbono y sorbitol como melobiosa. Éstas pueden utilizar isoleucina, metionina y treonina como fuentes de nitrógeno. Las cepas son sensibles a la furazolidona (Rijckaert, 1994. Citado por Vanneste, 2000).

Erwinia carotovora, las colonias desarrolladas en medio de cultivo agar nutritivo son de forma circular, borde liso, superficie convexa, color blanco cremoso, crecimiento abundante y reflectancia a la luz oblicua. Presenta tinción Gram negativa y flagelos peritricos. No hay crecimiento 37°C, el metabolismo de la glucosa se caracteriza por ser oxidativo fermentativo, en la prueba de reducción de sucrosa hay ausencia de un precipitado. Las cepas son positivas a la prueba de degradación de pectatos (Schaad et al., 2001).

2.6. Manejo de la pudrición del cogollo

La detección en los estados iniciales de la enfermedad evitará que se pierda totalmente el cogollo de la palma. La detección temprana de la PC permite la práctica de cirugías al cogollo de la palma. Esta práctica consiste en cortar las hojas mas afectadas, y con una herramienta filosa penetrar gradualmente dentro del cogollo hasta localizar tejido aparentemente sano haciendo al final un corte en bisel. Luego, el corte se trata con insecticida y fungicida de amplio espectro (Chinchilla, 2010). Esto permitirá en el mejor de los casos la recuperación de la palma.

Además, las medidas de control deben incluir el mejoramiento del drenaje dentro de la plantación para evitar la acumulación de agua en el cultivo durante las épocas de mayor precipitación. El exceso de agua y alta humedad relativa, causa estrés en la palma y favorece el desarrollo de la enfermedad (Torres et al., 2008; Chinchilla, 2010).

La captura de *Rhynchophorus palmarum* permite monitorear el estado de sus poblaciones en diferentes áreas de la plantación. Capturar el insecto es importante para establecer planes de manejo para evitar que sean atraídos por el tejido en proceso de pudrición e impedir que se alimenten de la zona meristemática de la palma, acrecentando así la posibilidad de su recuperación (Torres et al., 2008). El uso del "*rincoforol*", feromona de agregación producida por el macho de *R. palmarum*, permite aumentar la eficiencia de las capturas en 6-30 veces o más.

Por otra parte, se recomienda eliminar las plantas adultas enfermas con PC en lotes de baja incidencia. El no eliminar las plantas enfermas las convierte en una fuente de inóculo y propagación de *R. palmarum* (Torres et al., 2008).

2.7. El suelo y la nutrición en la incidencia de la PC

Acosta y Múnevar (2005), sugieren que la PC esta relacionada con el estrés nutricional y propiedades físicas y químicas del suelo. El Centro Nacional de Investigaciones en Palma Aceitera de Colombia (CENIPALMA) condujo investigaciones en las plantaciones de Manuelita

(San Carlos de Guaroa, Colombia) demostrando que la incidencia de la PC es generalmente mayor en zonas donde existen las siguientes limitantes físicas en el suelo (Acosta y Múnevar, 2005):

Suelos arcillosos, parcelas con cantidades significativas de arcilla en el horizonte superficial (0-40 cm) a menudo tienen el doble de incidencia de la infección (Figura 1).

Compactación, se encuentra una mayor presión de la enfermedad en plantaciones con mayor resistencia a la penetración.

Conductividad hidráulica, existe una significativa reducción de la frecuencia de la PC en parcelas con mejor drenaje.

Concentración de nutrientes, la relación entre la concentración de nutrientes (Tabla 1) y la PC se estudió en suelos sin las limitaciones físicas mencionadas anteriormente. Se estudiaron dos lotes de la plantación Manuelita, en San Carlos de Guaroa, Colombia. El lote 1 tenía baja incidencia de la enfermedad y palmas saludables y el lote 2 tenía palmas saludables únicamente. Las muestras tomadas del círculo alrededor del tronco (coronas) de palmas sanas y enfermas en ambos lotes determinaron que el suelo es más fértil en las coronas de palmas sanas, en comparación con las palmas afectadas por PC. Sin embargo no se ha observado diferencias en las concentraciones de nutrientes foliares (Acosta y Múnevar, 2005).

Viegas et al., 2000, citado por Fairhurst y Härdter (2012), midieron la concentración de micronutrientes: cobre, hierro, manganeso y zinc en las hojas de las plantas infectadas y sanas. Ellos encontraron que la concentración de hierro en la hoja No. 17 fue mayor en las palmas infectadas, lo que implica que la toxicidad por hierro puede ser un factor predisponente en la PC. De acuerdo con Chinchilla (2010), la fertilización debe ser en cantidades suficientes, oportuna (épocas y lugares de aplicación) y equilibrada (entre elementos). El principio del barril de Spengel-Liebig indica que cuando uno de todos los elementos esenciales está deficiente el rendimiento y la sanidad del cultivo se encuentran comprometidos.

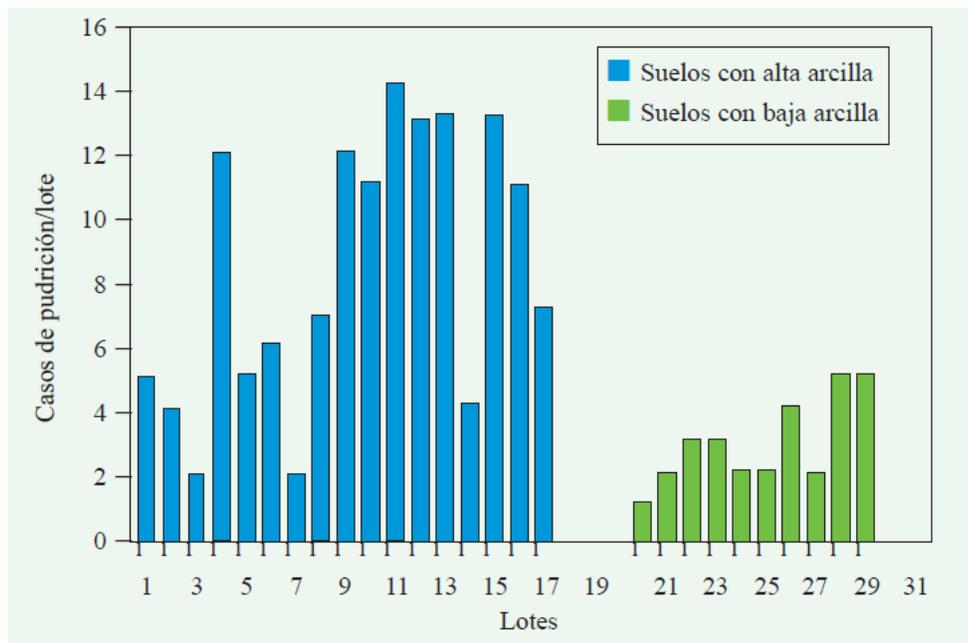


Figura 1. Los casos de infección de PC en plantaciones de palma aceitera localizadas en suelos con un contenido alto y bajo de arcilla en Colombia (Acosta y Múnevar, 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica

La recolección de muestras para el diagnóstico e identificación de organismos asociados a la enfermedad se realizó en siete plantaciones comerciales de palma aceitera (Tabla 1) ubicadas en los cantones de San Lorenzo y Quinindé en la Provincia de Esmeraldas, Ecuador (Figura 2).

Tabla 1. Ubicación geográfica de plantaciones comerciales de palma aceitera visitadas.

No.	Nombre de la plantación	Coordenadas planas UTM	Altitud (m.s.n.m.)
1	Aiquisa	N 18° 13,101' W 66° 56,432'	125
2	Kayalu	N 1° 12,369' W 78° 42,858'	170
3	Palesema	N 1° 12,790' W 78° 42,847'	175
4	Alespalma	N 1° 15,050' W 78° 48,194'	72
5	Palpailon	N 1° 13,983' W 78° 49,535'	86
6	Palmeras de los Andes	N 1° 13,620' W 78° 49,030'	121
7	Tabuche	N 0° 42.540' W 79° 33,858'	209

El aislamiento e identificación morfológica de microorganismos asociados a la PC y las pruebas de patogenicidad se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones de Palma de Aceitera (CIPAL) de la Asociación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite (ANCUPA), ubicado en el km 37 ½ vía Santo Domingo de los Tsáchilas-Quinindé. Sus coordenadas geográficas son: Latitud 0° 02'29" S, Longitud 79° 24' 54" O, a una altitud de 260 m.s.n.m. De acuerdo con la Estación Meteorológica del CIPAL, las características climáticas¹ son: temperatura promedio

24.2 °C, heliofanía 626 h/luz, humedad relativa 86%, precipitación anual 3071.26 mm y nubosidad 7/8.

La identificación molecular de patógenos se realizó en la Clínica de Diagnóstico de la Estación Experimental Agrícola de Juana Díaz, ubicada en la zona suroeste de Puerto Rico, en el km 3.1 de la carretera 510, Sabana Llana, Juana Díaz. Las coordenadas geográficas son: Latitud N 18° 01' 811", Longitud W 066° 31' 713", a una altitud de 23 m.s.n.m (Vega, 2009).

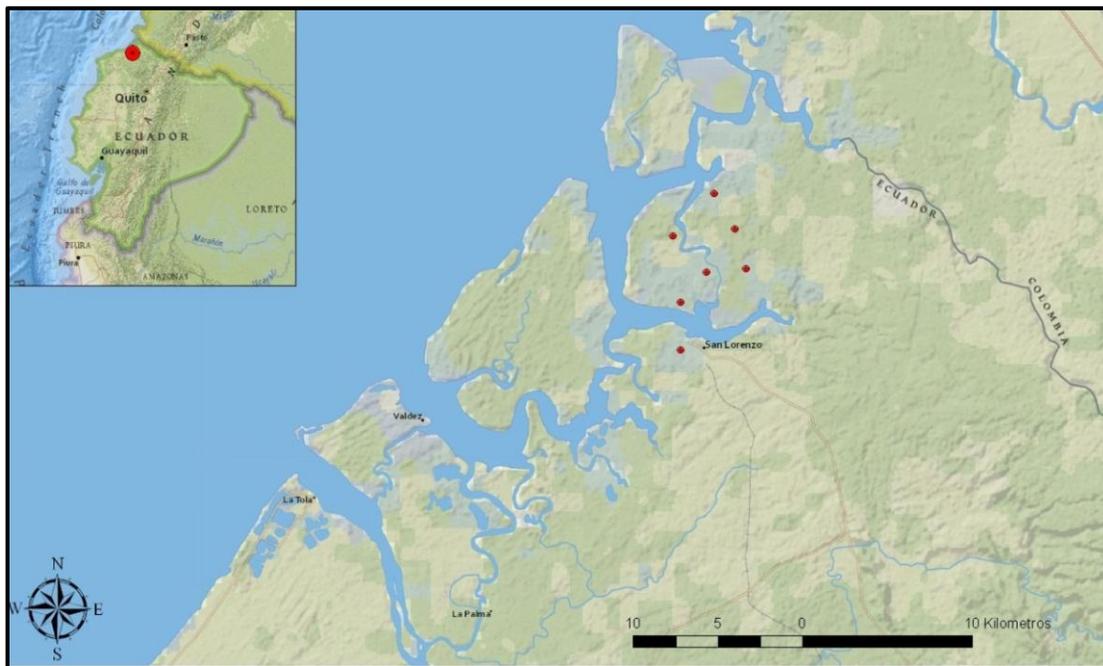


Figura 2. Ubicación geográfica de las plantaciones de palma aceitera muestreadas en el Cantón San Lorenzo de la Provincia de Esmeraldas, Ecuador.

3.2. Recolección de muestras de palma y de suelo

En el mes de junio del 2011, se colectaron muestras de tejido afectado y de suelo en siete plantaciones de la Provincia de Esmeraldas. Se estableció una escala de severidad de la enfermedad en base a síntomas visuales (Tabla 2). En cada plantación se seleccionaron de cuatro a seis palmas donde cada una correspondió a un grado en la escala de severidad.

Tabla 2. Escala de severidad utilizada para el muestreo de palma aceitera con PC

Escala de Severidad 1 -7	Síntomas
1: aparentemente sana	Sin síntomas visibles, palmas aparentemente sanas, hojas de color verde.
3: síntomas iniciales	Amarillamiento de las hojas más jóvenes, pequeñas lesiones necróticas en la flecha.
5: daño avanzado	Amarillamiento de las hojas más jóvenes, pudrición de la flecha, pudrición del cogollo.
7: palma muerta	Hojas de color grisáceo, secamiento de las hojas, pudrición del meristemo.

Las palmas seleccionadas fueron cortadas en la base del tallo y luego se realizó un corte longitudinal de la palma a nivel del cogollo usando una motosierra, se colectó material sintomático y asintomático de cuatro secciones de la palma: cogollo, flecha, meristemo apical y raíces. El material se colocó en fundas plásticas debidamente identificadas y se transportó en una nevera portátil al Laboratorio del CIPAL.

Además, con la ayuda de un barreno se colectó muestras de suelo en coronas de palmas sanas y enfermas, 500 gramos de suelo se colocaron en fundas plásticas debidamente identificadas y fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelos y Aguas del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP Santa Catalina en Ecuador, para el análisis de las propiedades químicas del suelo.

3.3. Aislamiento de hongos y bacterias asociados a la PC

3.3.1. Aislamiento de hongos

Se realizó la descripción de síntomas y signos de las muestras recolectadas en campo. Se cortó pequeñas secciones de tejido afectado de aproximadamente 4 a 6 mm y se desinfectó previamente con etanol al 70%, una solución de hipoclorito de sodio al 25% y tres enjuagues con agua destilada estéril, por un periodo de un minuto por cada muestra (Agrios, 2005). El tejido

desinfectado se transfirió a platos petri con medio de cultivo papa dextrosa agar con ácido láctico (APDA) al 25% (Apéndice 1). Los aislados fueron incubados a 26 °C durante 6 días. Los cultivos se purificaron y se realizaron cultivos monospóricos y de punta de hifa para proceder a su identificación utilizando los criterios morfológicos establecidos en las claves taxonómicas y realizar análisis de ADN.

Los aislamientos obtenidos se conservaron en papel filtro, utilizando cuadros de papel filtro (60-80) de 1 cm² esterilizados. Luego se colocaron 10 cuadros de papel filtro sobre medio de cultivo APDA, en el centro de la caja se colocó un disco de APDA que contenía el hongo a almacenar y se incubó a 24 °C durante 10 días. Posteriormente, se retiraron los cuadros de papel filtro con una pinza estéril y se colocaron en una caja Petri y se dejó secar por 7 días a 24 °C. Los papelitos se transfirieron a sobres de papel aluminio y se almacenaron a 4 °C (Mosquera et al., 2001).

3.3.2. Aislamiento de chromistas

Del tejido vegetal colectado en palmas se seleccionó secciones de tejido de raíz, cogollo, flecha, bases peciolares y meristemo apical, las muestras se lavaron con abundante agua de grifo durante 20 minutos, posteriormente se desinfectó con alcohol durante un minuto y tres enjuagues en agua destilada estéril, se eliminó el exceso de agua en papel toalla estéril (Sarria, et al., 2008). Para *Phytophthora*, los cortes de hojas y raíz se sembraron en medio de cultivo maíz y agar con adición de pimaricina, ampicilina, rimfampicina, pentacloronitrobenzeno (PARP) (Singleton, 1992) (Apéndice 2). Los cultivos fueron incubados en oscuridad durante una semana a 28 °C.

3.3.3. Aislamiento de bacterias

Desde tejido vegetal colectado en palmas de las diferentes plantaciones (Tabla 2), se seleccionó tejido sintomático correspondiente al meristemo o punto de crecimiento de la palma aceitera. Secciones de 4 a 6 mm de este tejido se colocaron en 5 ml de agua destilada estéril, se

dejó reposar durante 10 minutos para que las bacterias se difundan en el agua. El tejido no se desinfectó previamente porque el área del meristema no está expuesta a contaminantes (Agrios, 2005). Se transfirió 500 µl de la suspensión y se sembró en medio de cultivo agar nutritivo (AN) (Apéndice 3) (Schaad et al., 2001), los aislados fueron incubados a 28 °C durante 24 horas. Las colonias de 24 horas de crecimiento se purificaron mediante diluciones en serie (Schaad et al., 2001). Se sembraron las diluciones 10^4 y 10^5 en placas con medio de cultivo AN y se incubaron a 28 °C durante 24 horas (Schaad et al., 2001). Con las colonias obtenidas se repitió tres veces el proceso de purificación mediante diluciones en serie (Schaad et al., 2001) para asegurar la pureza de los aislados.

Para la conservación de los aislados bacteriano las colonias puras se multiplicaron en agar levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC) (Apéndice 4), luego de 48 horas de crecimiento se transfirieron a tubos de vidrio con agar suave (Apéndice 5) con ayuda de un cotonete de algodón estéril y se sellaron con papel parafilm a 4° C (Schaad et al., 2001).

3.4. Identificación morfológica de hongos

Para identificar los aislados se prepararon láminas porta objetos utilizando una gota de lactofenol con azul de algodón (0.05%) y una porción del micelio. Utilizando el microscopio (Olympus modelo Cx31, Olympus America Inc., Center Valley, PA) se tomaron medidas de 15 conidias al azar (largo y ancho) y se examinaron detalladamente las estructuras reproductivas de los diferentes aislados.

Se utilizaron las siguientes claves morfológicas para la clasificación de los diferentes géneros: Illustrated genera of imperfect fungi. Barnett, H y B. Hunter (1998), *Fusarium* Laboratory Manual de John F. Leslie and Brett A. Summerell (2006), Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints de Mannon E. Gallegly and Chuanxue Hong (2008).

3.5. Pruebas bioquímicas y de crecimiento para bacterias

3.5.1. Tinción Gram

Con un asa de platino se tomó una porción de cada aislado y se fijó la muestra en láminas porta objetos realizando un frotis, se aplicó el colorante cristal violeta al 1%, se realizó un enjuague con agua, se adicionó lugol compuesto por yodo y yoduro de potasio (KI) durante 3 minutos. Se enjuagó con gotas de decolorante alcohol-acetona y se realizó un nuevo enjuague con agua. La tinción de contraste se realizó con safranina durante dos minutos. Se observó las muestras en el microscopio para determinar la coloración y forma de las colonias. Las bacterias Gram negativas adquieren una coloración rojiza mientras que las Gram positivas conservan la coloración azul (Schaad et al., 2001).

3.5.2. Crecimiento a 37 °C

Los aislados bacterianos fueron sembrados en placas Petri con medio AN, las placas fueron colocadas en fundas plásticas para prevenir la desecación del medio y se incubó a 37 °C por tres días, posteriormente se observó el crecimiento de la bacteria en el punto de inoculación. Las colonias que tuvieron crecimiento en el punto de siembra fueron consideradas como miembros posibles de los géneros: *Erwinia*, *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Xylophilus*, *Pseudomonas*, *Xhantomonas* (Schaad et al., 2001).

3.5.3. Fluorescencia en King B

Colonias de los aislados bacterianos fueron crecidas en placas Petri con medio de cultivo King B (Apéndice 6) e incubadas a 28 °C. Se evaluó la presencia de fluorescencia a las 24 y 48 horas después de la siembra, una fluorescencia verde o azul indica la presencia de bacterias del género *Pseudomonas*. El género *Erwinia* no produce pigmentos fluorescentes en medio de cultivo King B (Schaad et al., 2001).

3.5.4. Prueba de la oxidasa

Esta prueba se realizó con las colonias Gram negativas, con el asa de platino se transfirió una colonia de 48 horas de crecimiento en agar nutritivo a la superficie de papel filtro impregnado con una gota de solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs), a los diez minutos se observó la reacción. Las colonias que no se tornaron púrpuras en 1 min fueron consideradas oxidasa negativa y fueron catalogadas como miembros del género *Erwinia* (Schaad et al., 2001).

3.5.5. Formación de pigmentos en YDC

Los aislamientos bacterianos se sembraron en medio de cultivo YDC (Apéndice 4) con la finalidad de examinar la formación de pigmentos. Los cultivos fueron incubados a 28 °C, se realizaron evaluaciones a las 24 y 48 horas después de la siembra. Algunas especies de *Erwinia* forman pigmentos de color rosado en medio YDC (Schaad et al., 2001).

3.5.6. Prueba de pectatos

En medio Cristal Violeta Pectato (CVP) (Apéndice 7) se colocó 100 µl de la suspensión bacteriana de los diferentes aislados y se homogenizó con un triángulo de metal estéril. Los platos se incubaron a 28 °C de 1 a 6 días hasta la formación de hendiduras en el medio de cultivo. Para confirmar la naturaleza pectolítica de los aislados que además provee un indicador de patogenicidad se utilizó tubérculos de papa. El tubérculo entero se desinfectó en hipoclorito de sodio al 5.25% durante 10 minutos y etanol al 70%. El tubérculo se cortó por la mitad y se inoculó la superficie del tejido con 1 ml de suspensión bacteriana de 24 horas de crecimiento (10^6 CFU/ml). Las mitades del tubérculo se volvieron a unir y se sellaron con plástico adherente, se incubó a 28 °C durante 48 horas. Al tocar el punto de inoculación con una espátula y este se hunde en el tejido es un indicativo de que la maceración ha ocurrido (Schaad et al., 2001).

3.5.7. Reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Se utilizó colonias de 48 horas de crecimiento en medio de cultivo YDC, las colonias se diluyeron en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 10^5 CFU/ml. Con una jeringa de insulina se inyectó 100 μ l de la suspensión bacteriana dentro del espacio intercelular de la hoja de tabaco. Se evaluó a las 48 y 72 horas después de la inoculación, la presencia de necrosis o reacción de hipersensibilidad en el punto de inoculación de la hoja de tabaco indica patogenicidad (Schaad et al., 2001).

3.5.8. Producción de ácidos a partir de carbohidratos

Esta prueba se realizó con los aislados patogénicos de la prueba de hipersensibilidad. Se preparó el medio C de Dye (Apéndice 8), se ajustó el pH a 6.8 añadiendo hidróxido de sodio al 40%. Se dispensó 15 ml del medio en tubos de vidrio y se esterilizó en un autoclave a 121°C por 20 minutos (Schaad et al., 2001). Se preparó una solución acuosa al 0.5% de carbohidratos, las fuentes fueron: trehalosa, cellobiosa, manitol, maltosa, sorbitol y dulcitol. Se esterilizó el dulcitol a 110°C por 20 min., los demás carbohidratos se esterilizaron por filtrado (Schaad et al., 2001). Se agregó la fuente de carbohidrato al 0,5% (v/v) al medio C. Los tubos se inocularon con el cultivo bacteriano de 48 de crecimiento y se incubaron a 28 °C. Se realizaron evaluaciones a los 2, 4, 6, 21 y 28 días después de la inoculación. La formación de un color amarillo en el medio indicó la producción de ácido (Schaad et al., 2001).

3.6. Identificación serológica

3.6.1. Tira serológica (Immunostrip®) para la detección de *Phytophthora* spp.

Para realizar el diagnóstico preliminar de chomistas se utilizó la tira serológica específica para *Phytophthora* (*Phytophthora* Immunostrip® Test, Agdia, Inc. Indiana, USA- ; Número de catálogo 92601) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La prueba se

realizó en muestras de raíz de plantas sintomáticas y asintomáticas de palma. Se colocó 0.1 g de raíz en una bolsa de malla conteniendo 1 ml de una solución salada de fosfato. El tejido de raíz se maceró, la tira serológica se colocó en contacto directo con la suspensión del buffer y el tejido de raíz. La lectura de la reacción se realizó en forma directa, clasificando la reacción como positiva (presencia de doble línea horizontal) y negativa (presencia de una línea horizontal).

3.6.2. ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas para la detección de *Phytophthora* spp.

Se utilizó secciones de tejido foliar (hoja bandera) y raíz proveniente del material vegetal colectado para la prueba PathoScreen® ELISA específico para *Phytophthora* sp. (*Phytophthora* PathoScreen® Kit. Agdia, Inc. Indiana, USA; Número de catálogo: PSA 92600) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se pesó 0.1 g de raíz en una bolsa de malla, el tejido se maceró con 1 ml de GBE (General Extraction Buffer), de la suspensión del buffer con el tejido macerado se tomó 100 µl y se agregó a cada celda de la placa ELISA con dos repeticiones, se incluyó el control positivo (Agdia, Indiana, USA; Número de catálogo: PSA 92600) y el control negativo compuesto por GBE. La placa ELISA se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda, transcurrido este tiempo la placa se enjuagó 6 veces con el buffer PBST 1X (Phosphate Buffered Saline with Tween 20 o PBST-20X) y se eliminó todo el residuo del buffer de las celdas.

Posteriormente se adicionó 100 µl del conjugado enzimático de fosfatasa alcalina en cada una de las celdas y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa de ELISA se enjuagó y se adicionó 100 µl del buffer PNP preparado a cada celda de la placa ELISA y se incubó por 60 minutos. La lectura de la reacción se realizó en forma directa, clasificando la reacción como positiva (cuando el color de la reacción fue color amarillo intenso), negativa (cuando el color de la reacción fue claro) o intermedia (el color de la reacción fue amarillo débil a claro).

3.6.3. Inmunoblot para la detección de *Erwinia carotovora*

Se utilizó cultivos bacterianos de 48 horas de crecimiento en medio de cultivo agar nutritivo. Con un asa se tomó una colonia de los aislados bacterianos y se diluyó en 1000 µl de agua destilada estéril contenidos en un tubo Eppendorf f. Se utilizó el inmunoblot para la detección de *Erwinia carotovora* (Inmunoblot assay *Erwinia carotovora*. Agdia, Inc. Indiana, USA; Número de catálogo PBK 90500/0096). Se tomó 3 µl de la solución bacteriana de cada aislado y se colocó sobre la membrana del inmunoblot, se incluyó el control positivo y el control negativo y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se adicionó a cada punto de la membrana 3 ml de una solución bloqueadora compuesta por leche en polvo descremada al 2% y el buffer PBST 1X. La membrana se incubó dentro de una bolsa plástica a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después de la incubación se agregó 15 µl del anticuerpo Ec, se volvió a incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se lavó la membrana cinco veces con buffer PBST 1X. Luego se agregó la solución de bloqueo y se adicionó el conjugado enzimático de fosfatasa alcalina y se incubó durante 45 minutos. Luego se lavó la membrana cinco veces durante dos minutos con el buffer PBST 1X. Se adicionó 3 ml del sustrato BCIP, se dejó reposar 5-10 minutos. La lectura de la reacción se realizó en forma directa, clasificando la reacción como positiva (cuando el color de la reacción fue color púrpura) y negativa (cuando no hubo ningún cambio).

3.6.4. ELISA para la detección de *Erwinia amylovora*

Se utilizó cultivos bacterianos de 48 horas de crecimiento en medio de cultivo agar nutritivo, para la detección se utilizó la prueba ELISA para *Erwinia amylovora* (1077-25 *Erwinia amylovora*. Agden Ltda. Scotland, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En un tubo Eppendorf con 2 ml del buffer de revestimiento a base de carbonato se agregó un cultivo bacteriano y se agitó en un vortex. Luego se adicionó 100 µl de la muestra a las celdas de la placa y se incluyó un control positivo (Agden Ltda. Scotland, UK) y negativo. La placa se colocó en cámara húmeda y se incubó a 4°C durante la noche. Al día siguiente se lavó la placa tres veces con el buffer PBST 1X. Posteriormente se agregó 200 µl del buffer de bloqueo (leche en

polvo descremada al 2% y buffer PBST 1X (Phosphate Buffered Saline with Tween 20 o PBST-20X) en cada celda. La placa se colocó en cámara húmeda y se incubó a 37°C durante una hora. Se realizó un segundo lavado y se adicionó 100 µl del anticuerpo en cada celda de la placa. La placa se incubó en cámara húmeda a 37°C durante dos horas. Se realizó otro lavado y se agregó 100 µl del conjugado enzimático en cada celda. La placa se incubó en cámara húmeda a 37°C durante una hora. Se realizó cuatro lavados. Finalmente se adicionó 100 µl del buffer sustrato en cada celda. La lectura de la reacción se realizó en forma visual, clasificando la reacción como positiva (cuando el color de la reacción fue color amarillo intenso), negativa (cuando el color de la reacción fue claro) o intermedia (el color de la reacción fue amarillo débil a claro).

3.7. Identificación molecular

3.7.1. Extracción de ADN de hongos y amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Se utilizaron cultivos monospóricos y de punta de hifa de los hongos aislados de la sección del cogollo y flecha, para cada aislado se tomaron 100 mg de micelio y se depositaron en un tubo Eppendorf de 2 ml de capacidad. Se coloraron 4 esferas de cristal (Eppendorf AG Hamburg, Germany) de 5 mm de diámetro por cada tubo y se realizó la extracción de ADN utilizando el DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, California, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se refrigeró a -20°C hasta su utilización.

Para la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal se utilizaron los iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Se utilizó un termociclador modelo T 3000 (Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen). Para realizar el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se utilizaron 12.5 µl del master mix Go Green Tag, 2.50 µl del primer ITS 1, 2.50 µl del primer ITS 4 y 2.50 µl de agua molecular por cada muestra. Se utilizó un volumen total de reacción de 25 µl, conteniendo: 20 µl de mezcla del master mix Go Green Tag y 5 µl del ADN de cada una de las muestras. La reacción de PCR consistió de un ciclo inicial de 94°C durante 1

minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, seguido de un ciclo final de extensión a 72°C por 6 minutos (White et al., 1990; Vega, 2009). El producto de PCR se almacenó a una temperatura de -20 °C.

3.7.2. Extracción de ADN de bacterias y amplificación por PCR

Se utilizaron aislados de 48 horas de crecimiento, positivos en la prueba de hipersensibilidad en tabaco. La extracción de ADN utilizando el Generation Capture Column Kit (Qiagen, California, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación de la región conservada del gen 16S del ARN ribosomal se utilizaron los iniciadores 1492 R: (5'-ACCTTGTTACGACTT-3') y 27 F: (5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') descrita por Lane *et al.*, (1991). Se utilizó un termociclador modelo T 3000 (Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen). En el PCR se utilizaron 12.5 µl del master mix Go Green Tag, 2.5 µl del primer 1429 R, 2.5 µl del primer 27 F y 2.50 µl de agua molecular por cada muestra. Se utilizó un volumen total de reacción de 25 µl, conteniendo: 20 µl de mezcla del master mix Go Green Tag y 5 µl del ADN de cada una de las muestras. La reacción de PCR consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 28 ciclos a 94°C por 1 minuto (desnaturalización), 53°C por 1 minuto (hibridación) y 72°C por 3 minutos (extensión), seguido de un ciclo final de extensión a 72°C por 1 minuto.

La visualización de los productos de PCR para hongos y bacterias se realizó en gel de agarosa (Sigma, St. Louis, USA) al 1.0%, teñido de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA). La electroforesis se realizó durante 45 minutos a 100 V, utilizando el amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de las bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioleta y el programa Quantity One, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con una escalera de peso de 100 a 1000 bp (Sigma, St. Louis, USA).

3.7.3. Purificación de productos de PCR

La purificación de productos del PCR para hongos y bacterias se realizó utilizando el Kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Qiagen, California, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello se añadieron 5 volúmenes del buffer PB por cada volumen del producto de PCR y se homogenizó en un vórtex. Posteriormente se colocó la mezcla en un tubo QIAquick y se centrifugó por 60 segundos a 13,000 rpm, se descartó el filtrado y se conservó el tubo colector y el filtro. Luego se añadió 750 µl del buffer PE en la columna QIAquick y se centrifugó por 60 segundos a 13,000 rpm. Se descartó el filtrado y se conservó la columna y el tubo colector, se centrifugó la columna por 1 minuto adicional. Se colocó el filtro de la columna QIAquick en un nuevo tubo de 1.5 ml, se añadieron 30 µl de buffer EB en el centro de la columna, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm, finalmente se almacenó el filtrado que constituye el ADN purificado.

3.7.4. Análisis de la secuencia de la región ITS y 16 S del ADN ribosomal

La secuenciación de los productos de PCR purificados de hongos y bacterias se realizó en MacroGen, Inc. en Rockville, USA (www.macrogenusa.com).

Las secuencias de los diferentes aislados se alinearon utilizando el programa informático BioEdit, versión 7.1.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). Una vez alineadas, se compararon sus homologías con la de otras especies existentes en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés NCBI, GenBank). El programa utilizado para dicha comparación fue BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.8. Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad se utilizó semillas germinadas de palma aceitera CIRAD código 2504 y semillas germinadas “híbridas OxG” (Murrin Corporation, Quinindé, Ecuador), considerados como material susceptible y material tolerante respectivamente. Las semillas se sembraron en substrato comercial (PROMIX®) en fundas de vivero de 15x23 cm de fondo plano, color negro estabilizadas por rayos UV. Las plantas se mantuvieron en el invernadero del CIPAL de marzo a septiembre del 2012.

3.8.1. Ensayo de patogenicidad con hongos y bacterias

En el mes de junio del 2012 en el invernadero del CIPAL se evaluaron 4 aislados bacterianos y un testigo inoculado con agua estéril (Tabla 3). Los aislados fueron crecidos en medio YDC por 48 horas. Se preparó una suspensión de la bacteria a una concentración de 10^5 CFU (Schaad et al., 2001), por medio de conteo en la cámara de Neubauer.

En el segundo ensayo se evaluaron 13 aislados fúngicos en inoculación individual y combinada, y un testigo inoculado con agua estéril (Tabla 4). Los aislados fueron crecidos en medio APDA e incubados a 28 °C durante 7 días. Se preparó una suspensión de *Fusarium* spp. a una concentración de 10^7 UFC por medio de la cámara de Neubauer. La inoculación se realizó con herida de 10 pinchazos en la base de la hoja más joven utilizando la aguja de una jeringa estéril, las plantas de 2 meses se inocularon con 1 ml de la suspensión bacteriana o fúngica y los controles se inocularon con 1 ml de agua destilada estéril.

Tabla 3. Aislamientos bacterianos inoculados en el ensayo de patogenicidad en palmas de vivero.

Aislado	Bacteria	Sección	Origen del aislado
10	<i>Erwinia carotovora</i>	Flecha	Aiquisa
11	<i>Erwinia amylovora</i>	Flecha	Tabuche
19	<i>Erwinia amylovora</i>	Meristemo apical	Palmeras de los Andes
16	<i>Erwinia carotovora</i>	Flecha	Tabuche
Testigo		Agua estéril	

La evaluación se realizó cada dos días para verificar la aparición de síntomas, se utilizó una escala visual para determinar la severidad de 1 a 7, siendo 1: sana, sin síntomas visibles, con tejido verde, 3: amarillamiento de las hojas, pequeñas lesiones en la hoja más joven, 5: amarillamiento de hojas, pudrición de la hoja mas joven, y 7: planta muerta, maceración de los tejidos del meristemo (Estévez com. pers.).

Tabla 4. Pruebas de patogenicidad en palmas de vivero con diferentes aislados de *Fusarium*.

Aislado	Hongo	Sección	Origen del aislado
12	<i>F. solani</i>	Raíz	Kayalú
28	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	Palpailón
50	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	PDA
31	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	PDA
32	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	PDA
94	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	Kayalú
65	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	Tabuche
69	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	Palpailón
70	<i>F. oxysporum</i>	Raíz	Palpailón
87	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	PDA
90	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	PDA
84	<i>Fusarium</i> sp.	Flecha	PDA
70+12	<i>Fusarium</i> spp.	Raíz	Palpailón, Kayalú
70+69	<i>Fusarium</i> spp.	Raíz, flecha	Kayalú, Palpailón
62+12	<i>Fusarium</i> spp.	Base peciolar, raíz	Palesema, Kayalú
69+87	<i>Fusarium</i> spp.	Flecha	Palpailón, PDA
Testigo	----	----	Agua estéril

3.8.2. Reaislamiento de patógenos

Se realizaron aislados desde el tejido sintomático de las plantas inoculadas. Para el aislamiento en medio PDA se utilizó la metodología descrita anteriormente, una vez descritas las características morfológicas se procedió a realizar la extracción de ADN de los hongos aislados de acuerdo con la metodología descrita para la identificación molecular de hongos.

3.9. Análisis estadístico

El contenido de nutrientes de las muestras de suelo colectadas en las plantaciones de palma aceitera se correlacionó con la severidad de la enfermedad mediante el programa estadístico Infostat versión estudiantil (InfoStat, 2005).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el muestreo realizado en siete plantaciones del Cantón San Lorenzo y Quinindé, se determinó que la PC presentó variación en la sintomatología según la localidad. En las plantaciones muestreadas, se colectó un total de 132 muestras (Tabla 5) de cuatro secciones de la palma (cogollo, flecha, meristemo apical y raíces). De acuerdo con la escala de severidad establecida para el estudio (Tabla 2), las muestras analizadas estuvieron conformadas de tejido afectado por PC en estados iniciales, intermedio y avanzado. En las plantaciones Aiquisa, Kayalú, Palesema, PDA, Palpailón, Alespalma y Tabuche, se observó que la PC se propagó rápidamente al cogollo ocasionando la muerte repentina de la palma. Esta sintomatología es similar a lo reportado en Tumaco provincia cercana a San Lorenzo (Elliott, 2009). En las mismas plantaciones también se observó casos en donde la enfermedad no se propagó con rapidez al cogollo. De acuerdo con Elliott (2009), la diferencia en la manifestación de los síntomas de la PC puede estar relacionada con las condiciones ambientales locales, las cuales pueden ser o no propicias para el desarrollo de la enfermedad.

En la plantación Aiquisa se muestreo el lote identificado como 8A, con material Deli x Ghana de 5 años de edad. En esta área la enfermedad estuvo dispersa, las palmas afectadas presentaban amarillamiento de las hojas jóvenes o cogollo, acompañado de necrosis de la flecha con o sin doblamiento. Los síntomas internos se caracterizaron por pudrición descendente de flecha hasta el meristemo apical, en palmas con daño inicial la pudrición no alcanzó el meristemo (Estévez de Jensen, 2011). También se distinguió palmas sin amarillamiento del cogollo y presentaban necrosis en diversas áreas de la flecha (Figura 3). En el sistema radicular, las raíces cuaternarias fueron escasas, quebradizas y mostraron necrosis, en las palmas muestreadas fue notoria la reducción de raíces absorbentes.

Desde las muestras colectadas en esta plantación no se logró aislar *Phytophthora* desde tejido de raíz y flecha. Las pruebas de serología fueron negativas para la presencia de *Phytophthora*. Desde raíz se obtuvo un aislado de *Fusarium* sp. En relación a bacterias se identificó a *Erwinia carotovora* de acuerdo con la prueba de serología realizada.

Tabla 5. Muestras colectadas en las siete plantaciones de palma aceitera muestreadas en la Provincia de Esmeraldas.

Plantación	Muestra	Altitud	Coordenadas	Material	Edad (años)
Aiquisa	A1	125	18° 13'101"N 66° 56'432"W	Deli x Ghana	5
	A2	128	01° 08' 018"N 78° 47'261"W	Deli x Ghana	5
	A3	117	01° 08'006"N 78° 47'254"W	Deli x Ghana	5
	A4	135	1° 0'7988"N 78° 47'251"W	Deli x Ghana	5
	A5	143	1° 08'037"N 78° 47'265"W	Deli x Ghana	5
	A6	123	1° 08'050"N 78° 47'223"W	Deli x Ghana	5
Kayalú	K1	225	1° 12'369"N 78° 42'858"W	guineensis	6
	K2	179	1° 12'770"N 76° 42'838"W	guineensis	4
	K3	165	1° 12'779"N 78° 42'847"W	guineensis	4
	K4	ND	1° 12'790"N 78° 42'848"W	guineensis	4
Palesema	P1	175	1° 12'790"N 78° 42'847"W	Coari x Lamé	2
	P2	271	1° 16'932"N 72° 44'978"W	Coari x Lamé	2
	P3	264	1° 16'934"N 78° 24'984"W	Coari x Lamé	2
	P4	268	1° 16'868"N 78° 44'958"W	Coari x Lamé	2
	P5	249	1° 17'098"N 78° 45'305"W	guineensis	10

Tabla 5. Muestras colectadas en las siete plantaciones de palma aceitera en la Provincia de Esmeraldas (Continuación).

Plantación	Muestra	Altitud	Coordenadas	Material	Edad (años)
Alespalma	AI 1	142	1° 15'050"N 78° 48'194"W	Deli x Avros	11
	AI 2	122	1° 15'046"N 78° 48'194"W	Deli x Avros	11
	AI 3	103	1° 14'616"N 78° 49'616"W	Deli x Avros	11
	AI 4	72	1° 14'625"N 78° 49'185"W	Deli x Avros	11
Palpailón	Pal 1	125	1° 13'983"N 78° 49'535"W	Deli x Avros	10
	Pal 2	99	1° 13'992"N 78° 49'526"W	Deli x Avros	10
	Pal 3	86	1° 13'995"N 78° 49'548"W	Deli x Avros	10
	Pal 4	96	1° 13'619"N 78° 49'629"W	Deli x Avros	10
Palmeras de los Andes	Pda1	121	1° 13'620"N 78° 49'30"W	Coari x Lamé	2
	Pda 2	204	1° 14'666"N 78° 45'44"W	Coari x Lamé	2
	Pda 3	ND	1° 17'618"N 78° 42'884"W	Coari x Lamé	2
	Pda 4	ND	1° 17'609"N 78° 42'850"W	Coari x Lamé	2
	Pda 5	ND	1° 16'843"N 78° 41'357"W	Coari x Lamé	2
	PDA6	136	1° 07'917"N 78° 54'209"W	guineensis	4
Tabuche	T1	243	0° 42'540"N 79° 33'858"W	guineensis	6
	T2	226	0° 42'549"N 79° 33'856"W	guineensis	6
	T3	220	0° 42'548"N 79° 33'845"W	guineensis	6
	T4	209	0° 42'550"N 79° 33'849"W	guineensis	6

*ND: No disponible

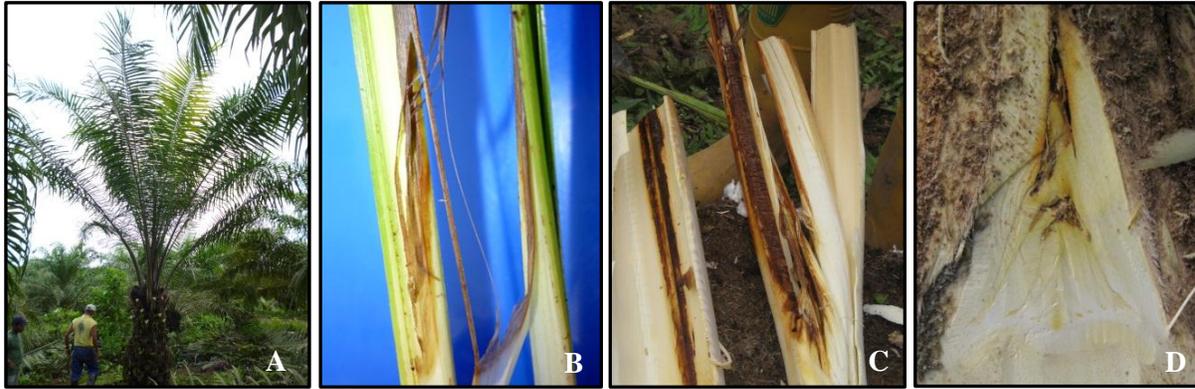


Figura 3. Sintomatología interna y externa de palmas con PC en la plantación Aiquisa. A) Amarillamiento del cogollo; B) Lesiones necróticas en tejido de la flecha; D) Pudrición de la flecha; E) Pudrición del meristemo apical.

En la plantación Kayalú, se muestrearon palmas de material guineensis de 4 y 8 años de edad. La enfermedad estuvo generalizada, las palmas mostraron síntomas típicos de amarillamiento del cogollo y pudrición descendente de la flecha. Se muestrearon palmas con síntomas iniciales de la enfermedad, estas presentaron pequeñas áreas necróticas en la flecha de color café claro. Las palmas en estado avanzando mostraron pudrición descendente de la flecha hasta el meristemo apical, se observó la presencia de fibras de color negro en la parte inferior del estipe (Figura 4B) (Estévez de Jensen, 2011). De acuerdo con Elliott (2009), las fibras oscuras en la base del estipe son parte de la anatomía y desarrollo normal de la palma aceitera y otras especies de palmas, estas fibras se puede encontrar en palmas enfermas o sanas. El análisis del sistema radicular se mostró poco desarrollo en palmas con síntomas avanzados de la enfermedad, la presencia de raíces cuaternarias fue escasa (Figura 4C).

Desde flecha, raíz y bases peciolares se obtuvieron siete aislados de *Fusarium* spp., uno de los aislados de raíz fue identificado como *Fusarium solani*. No se logró aislar a *Phytophthora* y las pruebas de serología no detectaron al cromista. Se obtuvo un aislado bacteriano Gram negativo que de acuerdo al análisis serológico fue negativo para *Erwinia* spp. En la plantación Palmeras de los Andes (PDA), se muestrearon palmas de vivero del híbrido Coari x Lamé y

palmas guineensis de 4 años de edad. En palmas de vivero se observó clorosis de las hojas con lesiones necróticas en la base de los folíolos, sin embargo el punto de crecimiento estuvo sano.



Figura 4. Sintomatología interna y externa de palmas con PC en la plantación Kayalú. A) Amarillamiento del cogollo; B) Fibras negras en la base del estipe; C) Ausencia de raíces cuaternarias.

Las palmas fueron desprendidas de la funda de vivero y se notó necrosis de raíces (Figura 5). En palmas adultas, se observó el típico amarillamiento del cogollo y pudrición de la flecha, en algunos casos no presentó doblamiento. La sintomatología interna se caracterizó por pudrición descendente de la flecha hasta alcanzar el meristemo causando maceración del tejido. Las raíces cuaternarias fueron escasas y con síntomas de pudrición. De las muestras colectadas, desde flecha y raíz se obtuvieron diez aislados de *Fusarium* spp., uno de estos aislados obtenido desde la flecha se identificó como *F. equiseti*. Con la tira serológica se detectó a *Phytophthora* en tejido de raíz de una palma híbrido de 2 años de edad. Se identificó a *Erwinia amylovora* de acuerdo con las pruebas de serología.

En la plantación Palesema se muestreo en el lote 317 con material Coari x Lamé de 2 años y en el lote 34 con palmas guineensis de 10 años. Los síntomas observados fueron consistentes en cuanto a amarillamiento del cogollo y pudrición de la flecha. Sin embargo, en el híbrido las hojas presentaron bordes cloróticos paralelos a la vena central (Figura 6). De acuerdo al estado de desarrollo de la enfermedad las palmas presentaron pudrición descendente que alcanzó o no el meristemo. Los síntomas en estado avanzado en material guineensis se

caracterizaron por pudrición severa del cogollo acompañado de mal olor y el sistema radicular presentó necrosis y escaso desarrollo.



Figura 5. Palmas de vivero en la plantación PDA. A) Sistema radicular escaso en planta sintomática; B) Sistema radicular abundante en palma asintomática; C) Amarillamiento de hojas y pudrición de la hoja más joven.

Desde tejido de raíz y bases peciolares se obtuvieron 3 aislados de *Fusarium* spp. No se logró aislar a *Phytophthora*, sin embargo, en una muestra de raíz del híbrido Coari x Lamé se detectó mediante tira serológica. Se obtuvieron cinco aislados bacterianos, unos de ellos se identificó como *E. amylovora*.



Figura 6. Sintomatología de palmas híbridas con PC en la plantación Palesema. A) Pudrición de la flecha; B) Amarillamiento del cogollo; C) Bordos cloróticos en foliolos.

En la plantación Alespalma se muestreo el lote S004 y 20 con material ASD de 11 años. Los síntomas se caracterizaron por el amarillamiento del cogollo, pudrición descendente de la flecha acompañada de maceración de tejido en el meristemo. Además, se observó un sistema radicular escaso con pocas raíces absorbentes. Palmas asintomáticas dentro de un sector con alta incidencia de PC mostraron un sistema radicular escaso y se observó necrosis extendida hacia las raíces secundarias y terciarias (Figura 7). En esta plantación no se aisló a *Fusarium* ni *Phytophthora* desde ninguna de las muestras colectadas. Las pruebas de serología no detectaron a *Phytophthora* en tejido de raíz ni flecha. Además, no se obtuvieron aislados bacterianos.

En la plantación Palpailón, en el lote I9 con material ASD de 10 años las palmas presentaron alta incidencia y severidad de la enfermedad que se caracterizó por la muerte de las palmas afectadas. El síntoma característico fue el amarillamiento del cogollo, en algunas palmas que presentaron este síntoma no se encontró necrosis ni pudrición de la flecha (Figura 8). Además, se observó palmas que presentaron lesiones necróticas en la flecha extendidas hasta el ápice, en este caso la pudrición no avanzó al meristemo. También, se encontró palmas con pudrición avanzada que ocasionó maceración de tejidos del meristemo con mal olor. Desde tejido de flecha y raíz se obtuvo dos aislados de *Fusarium* spp., uno de ellos fue identificado como *F. oxysporum*. No se logró aislar a *Phytophthora*, las pruebas de serología no detectaron al cromista en raíz y flecha. No se obtuvieron aislados bacterianos desde las muestras colectadas.



Figura 7. Sintomatología interna y externa de PC en la plantación Alespalma. A) Amarillamiento del cogollo; B) Pudrición descendente que avanza al meristemo; C) Sistema de raíces absorbentes escaso.



Figura 8. Sintomatología interna y externa de PC en la plantación Palpailón. A) Amarillamiento del cogollo; B) Pudrición de la flecha; C) Ausencia de pudrición descendente.

Finalmente, en el Cantón Quinindé en la plantación Tabuche sembrado con material guineensis, la enfermedad estuvo distribuida de manera uniforme, la mayoría de las palmas del lote muestreado presentaron síntomas de amarillamiento del cogollo, pudrición de la flecha con doblamiento (Figura 9). Además en una de las palmas muestreadas hubo presencia de micelio, siendo este el único caso de observación de signos durante todo el proceso de muestreo. En esta plantación se observaron los síntomas típicos de la PC, el amarillamiento del cogollo estuvo acompañado de pudrición descendente de la flecha hasta el meristemo, resultando en una maceración completa del tejido acompañado de exudado bacteriano de color crema.

Desde tejido de flecha y raíz se obtuvieron dos aislados, uno de *F. solani* y otro de *Fusarium* sp. No se aisló ni detectó a *Phytophthora* desde tejido de raíz y flecha. Se obtuvieron cinco aislados bacterianos, identificados como *E. amylovora* y *E. carotovora* de acuerdo con las pruebas serológicas.



Figura 9. Sintomatología interna y externa de PC en la plantación Tabuche. A) Amarillamiento del cogollo; B) Pudrición de la flecha con doblamiento; C) Maceración de tejidos meristemáticos.

De manera general, los síntomas externos de la PC incluyen: amarillamiento de las hojas jóvenes (cogollo), necrosis en áreas de la flecha y en estados avanzados de la enfermedad se observa pudrición y doblamiento de la flecha. Los síntomas internos se caracterizan por una pudrición descendente que alcanza el meristemo apical, en estados avanzados se puede observar maceración de tejidos. Al examinar el sistema radicular se observó raíces cuaternarias escasas y presentan o no necrosis. Chinchilla (2010), describe que los síntomas de la PC pueden o no estar precedidos de clorosis (amarillamiento) en porciones dispersas de las hojas más jóvenes, pero particularmente en la base de algunos folíolos de la base. Las pudriciones pueden penetrar profundamente en la región del cogollo y causar la muerte de las plantas. El desarrollo radical particularmente las raíces finas se encontraron alteradas, lo cual normalmente ocurre aún antes de que se desarrollen los síntomas aéreos.

4.1. Microorganismos asociados a la PC

Se obtuvieron 83 aislados fúngicos (Tabla 6), el 36.59% de los hongos aislados correspondieron a *Fusarium* spp. Otros géneros aislados fueron *Colletotrichum* spp. (8.43%), *Pestalotia* spp. (7.23 %), *Curvularia* spp. (6.02 %) y *Alternaria* spp. (4.82 %). La mayoría de los

hongos fueron identificados a nivel de género, basados principalmente en las estructuras de reproducción. Algunos micelios estériles no pudieron ser identificados debido a que no produjeron estructuras de reproducción que facilitara su identificación. Similar a los estudios de microorganismos asociados a la PC en Colombia, los más frecuentes fueron *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. (Sarria et al., 2008). En medio de cultivo selectivo PARP no se aisló *Phytophthora* desde tejido de cogollo, flecha, bases peciolares, meristemo apical y raíces. En contraste con los estudios de Colombia donde se reporta a *Phytophthora palmivora* como el agente causal de la pudrición del cogollo en la palma aceitera (Torres et al., 2010)

Por otro lado, el 18.07% de los aislados de hongos correspondieron al género *Trichoderma*. En plantaciones de San Lorenzo se ha trabajado con el uso de alternativas biológicas para el control de la PC, principalmente con el hongo antagonista *Trichoderma* spp. Es probable que la alta frecuencia de aparición de *Trichoderma* spp. se deba a que en plantaciones como Energy Palm, Alespalma y Palpailón se han realizado aplicaciones de biofungicidas a base *Trichoderma* spp.

Para el caso de bacterias, se obtuvieron 29 aislados bacterianos, los géneros más frecuentes fueron *Erwinia* spp. (31.03%) y *Bacillus* spp. (17.24%) (Tabla 7). Estos resultados concuerdan con los de Sarria y colaboradores (2008) donde *Erwinia* spp. fue aislada con mayor frecuencia de palmas afectadas con pudrición del cogollo.

Tabla 6. Frecuencia de aparición de hongos aislados desde tejido con PC en plantaciones de palma aceitera en la Provincia de Esmeraldas.

Hongo	No. Aislados	Porcentaje	Estructura afectada
<i>Acremonium</i> spp.	1	1.20	Flecha
<i>Alternaria</i> spp.	4	4.82	flecha, foliolos del cogollo, raíz
<i>Cladosporium</i> spp.	3	3.61	flecha, foliolos del cogollo
<i>Colletotrichum</i> spp.	7	8.43	flecha, raíz
<i>Curvularia</i> spp.	5	6.02	flecha, foliolos del cogollo, raíz
<i>Diaporthe</i> spp.	1	1.20	Flecha
<i>Fusarium</i> spp.	30	36.59	flecha, foliolos del cogollo, raíz.
<i>Nigrospora</i> spp.	2	2.41	flecha, raíz
<i>Pestalotia</i> spp.	6	7.23	base de los foliolos, raíz
<i>Phoma</i> spp.	2	2.41	foliolos del cogollo, raíz
<i>Polypore</i> spp.	1	1.20	Flecha
<i>Trichoderma</i> spp.	15	18.07	Raíz
Micelio estéril	5	6.02	foliolos del cogollo, raíz
Total	83	100.00	

Tabla 7. Frecuencia de bacterias aisladas desde tejido con síntomas de PC en la Provincia de Esmeraldas.

Bacteria	No. Aislados	Porcentaje	Estructura Afectada
<i>Erwinia</i> spp.	9	31.03	flecha y meristemo apical
<i>Bacillus</i> spp.	5	17.24	flecha y meristemo apical
<i>Klebsiella</i> spp.	2	6.90	flecha y meristemo apical
Otras Gram negativas	8	27.59	flecha y meristemo apical
Otras Gram positivas	7	17.24	flecha y meristemo apical
Total	29	100.00	

4.2. Identificación morfológica y molecular del género *Fusarium*

4.2.1. Identificación morfológica de *Fusarium* spp.

Del muestreo en plantaciones de palma aceitera en la Provincia de Esmeraldas, se obtuvieron 30 aislamientos del género *Fusarium*, de los cuales se seleccionaron 16 aislamientos de acuerdo a las características morfológicas de las macro y microconidias sobre medio APDA y en base a que se aislaron desde la flecha, bases peciolares y raíz (Tabla 8). Los principales géneros identificados fueron *F. oxysporum* y *F. solani*.

Tabla 8. Origen e identificación taxonómica de los aislamientos de *Fusarium*, obtenidos desde flecha y bases peciolares en palma aceitera con PC.

Aislado	Plantación	Sección	Identificación Morfológica
12*	Kayalú	Flecha	<i>Fusarium oxysporum</i>
15		bases peciolares	<i>Fusarium</i> spp.
50*		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
51		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
53		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
54		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
99		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
28*	Palmeras de los Andes	Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
30		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
31*		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
32*		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
36		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
37		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
39		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
87*		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
90*		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
95	Flecha	<i>Fusarium</i> spp.	
62*	Palesema	bases peciolares	<i>Fusarium</i> spp.
94*		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
96		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.

Tabla 8. Origen e identificación taxonómica de los aislamientos de *Fusarium*, obtenidos desde flecha y bases peciolares en palma aceitera con PC (Continuación).

69*	Palpailón	Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
70*		Flecha	<i>Fusarium oxysporum</i>
1	Aiquisa	Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
73		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
44		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
41*	Tabuche	Flecha	<i>Fusarium solani</i>
42*		Flecha	<i>Fusarium</i> spp.
65*		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.
68*		Flecha	<i>Fusarium solani</i>
84*		Raíz	<i>Fusarium</i> spp.

*Aislamientos seleccionados

4.2.1.1. *Fusarium oxysporum*

Sobre medio de cultivo APDA todos los aislamientos de *F. oxysporum* tuvieron rápido crecimiento de micelio aéreo y blanco, que en algunas ocasiones varió a púrpura. Las microconidias midieron en promedio 5.53 ± 0.68 μm de largo y 2.61 ± 0.35 μm de ancho, y las macroconidias midieron en promedio 31.05 ± 6.75 μm de largo y 3.17 ± 0.72 μm de ancho (Apéndice 9). Las microconidias fueron producidas a partir de falsas cabezas y las macroconidias presentaron una célula apical bastante atenuada y una célula basal formando un pie (Figura 10).

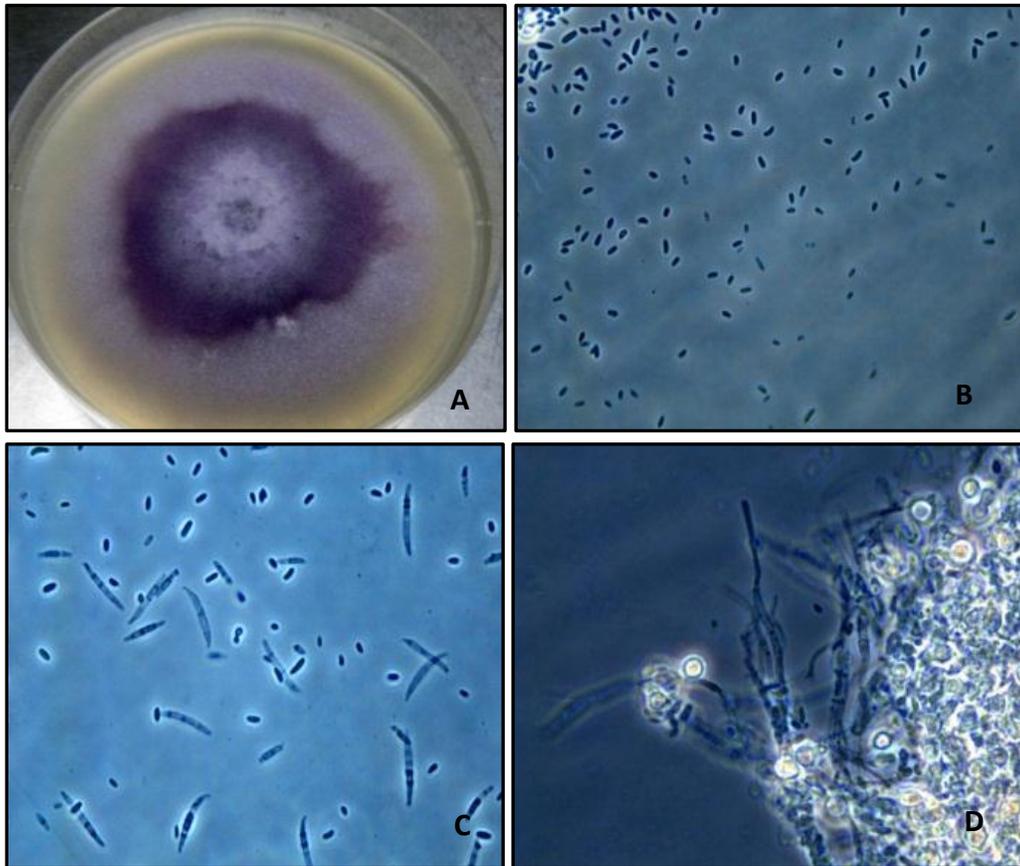


Figura 10. A) Cultivo de *Fusarium oxysporum* en medio APDA; B) Microconidias; C) Macroconidias y microconidias y C) Clamidosporas. B, C y C. Microscopio en contraste de fase, lente 40x.

4.2.1.2. *Fusarium solani*

En medio de cultivo APDA todos los aislamientos de *F. solani* desarrollaron micelio color blanco cremoso poco abundante con presencia de esporodocios. Las características distintivas fueron: microconidias más largas que midieron en promedio $11.36 \pm 1.41 \mu\text{m}$ de largo y $4.45 \pm 0.58 \mu\text{m}$ de ancho, mientras que las macroconidias midieron en promedio $30.81 \pm 2.95 \mu\text{m}$ de largo y $5.44 \pm 0.48 \mu\text{m}$ de ancho (Apéndice 9). Las microconidias son de pared más gruesa y producidos en menor cantidad y las macroconidias fueron más gruesas (Figura 11). De acuerdo con Leslie y Summerell (2006), los cultivos de *F. solani* en medio papa dextrosa agar

usualmente son de color blanco a crema con micelio escaso. La macroconidia es relativamente recta, corpulenta y robusta.

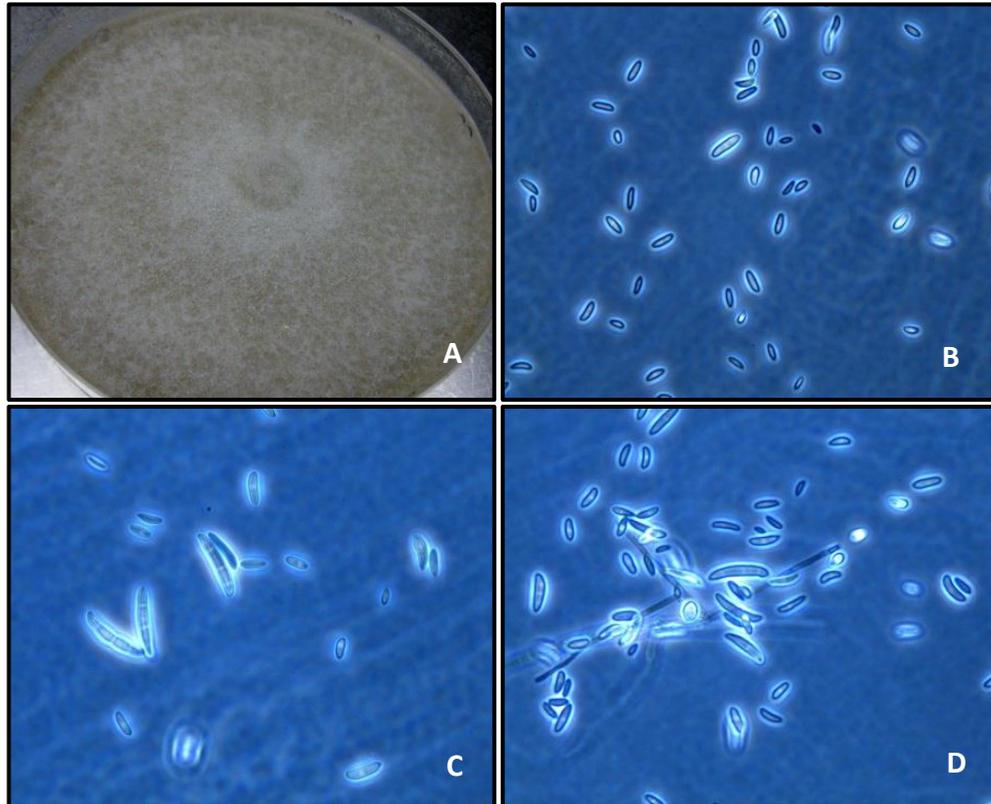


Figura 11. A) Cultivo de *Fusarium solani* en medio APDA; B) Microconidias; C y D) Macroconidias y microconidias. B, C y D. Microscopio en contraste de fase, lente 40x.

4.2.1.3. Identificación molecular de *Fusarium* spp.

Se realizó la identificación molecular de los aislados de *Fusarium* codificados como: 41, 54, 50, 89, 90, 42, 12, 84 y 70. En todos los aislados se obtuvo una banda de ADN con 500 pares de bases (pb) producto de la amplificación con los cebadores ITS1 e ITS4 (Figura 12), correspondiente con el peso molecular para hongos utilizando cebadores universales, el cual está enmarcado entre 500 y 570 pb (Abd-Elsalam, 2003).

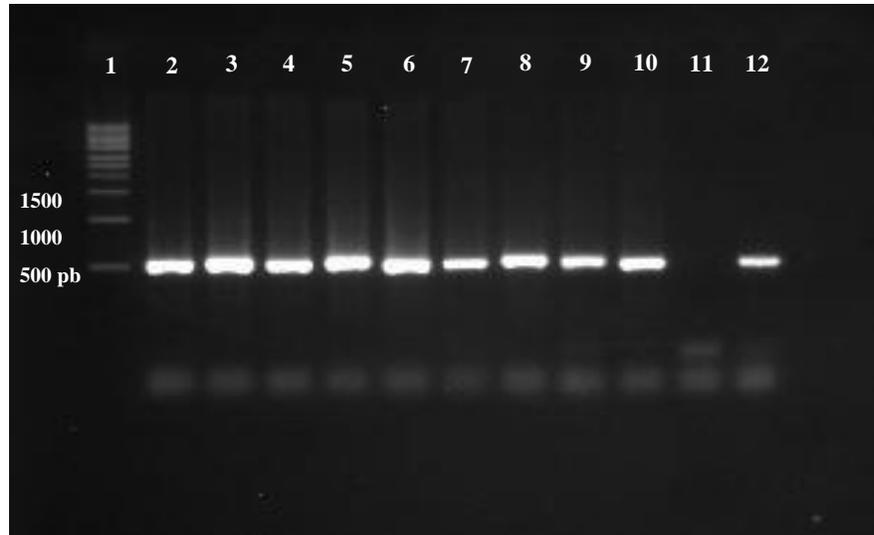


Figura 12. Gel de agarosa al 1% con productos de amplificación de la región ITS de 500 pb. Carril 1: marcador 1 kb. Carril 2-10 aislados de *Fusarium* (41, 54, 50, 89, 90, 42, 12, 84 y 70). Carril 11 y 12 control negativo y positivo.

Las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de los aislados 41, 54, 50, 89, 90, 42, 12, 84 y 70, comparadas con la secuencias depositadas en el Gen Bank (Tabla 9), a través del BLAST correspondieron a diferentes especies de *Fusarium*. Los aislados 12 y 70 con número de acceso al Gen Bank JX896998 y JX897002, mostraron un porcentaje de homología del 100% con las secuencias de *F. solani* y *F. oxysporum* respectivamente (Tabla 9). Los aislados 54 y 68 con número de acceso al Gen Bank JX897000 y JX897001, mostraron un porcentaje de homología del 99% con las secuencias de *F. solani*, de igual manera el aislado 41 con número de acceso al Gen Bank JX896995, mostró 99% de homología con la secuencia de *F. oxysporum*. Únicamente el aislado 90 correspondió a *F. equiseti* con el 99% de homología.

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

Tabla 9. Identificación molecular de especies de *Fusarium* aislados desde tejido de palma aceitera con PC, utilizando la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal y el programa BLAST.

Datos del aislado		Identificación en GenBank			
Numero de acceso GenBank ^a	Aislado	Descripción	Numero de acceso	Cobertura (%)	Homología (%)
JX896998	12	<i>Fusarium solani</i>	EU214559.1	100	100
JX896995	41	<i>Fusarium oxysporum</i>	JN020659.1	99	99
JX896999	42	<i>Fusarium</i> sp.	AY842395.1	99	98
JX896996	50	<i>Fusarium</i> sp.	HQ223034.1	99	99
JX897000	54	<i>Fusarium solani</i>	JX173101.1	99	99
JX897001	68	<i>Fusarium solani</i>	EU733636.1	99	99
JX897002	70	<i>Fusarium oxysporum</i>	JF807394.1	99	100
JX897003	84	<i>Fusarium</i> sp.	EU214560.1	100	99
JX896997	90	<i>Fusarium equiseti</i>	GQ352485.1	100	99

^a Código asignado en GenBank para la secuencia reportada

4.3. Identificación serológica del género *Phytophthora*

De las 35 muestras de raíces colectadas en las plantaciones de palma aceitera, se determinó la presencia de *Phytophthora* spp. en las muestras PDA4 y P2 con escala de severidad 1 y 3 respectivamente (Tabla 10). De acuerdo con la escala de severidad establecida para el estudio (Tabla 2), el grado 1 corresponde a una planta aparentemente sana y el grado 3 a una palma con síntomas iniciales de la PC. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Fairhurst y Härdter (2012) en donde mencionan que *Phytophthora palmivora* es uno de los patógenos más comunes que ocurren en la raíz. En muestras de tejido de flecha y base de los foliolos no se detectó la presencia de *Phytophthora* spp. en ninguna de las muestras analizadas.

Tabla 10. Detección de *Phytophthora sp.* con DAS-ELISA y la tira serológica (ImmunoStrip® Test, Agdia, Inc.).

Plantación	Muestra	Escala de Severidad	DAS-ELISA*	Tira serológica*
AIQUISA	A1	3	-	-
	A2	7	-	-
	A3	1	-	-
	A4	5	-	-
	A5	3	-	-
	A6	5	-	-
ALESPALMA	AL1	7	-	-
	AL2	1	-	-
	AL3	3	-	-
	AL4	5	-	-
KAYALU	K1	3	-	-
	K2	5	-	-
	K3	7	-	-
	K4	1	-	-
PDA	PDA1	5	-	-
	PDA2	5	-	-
	PDA3	5	-	-
	PDA4	1	-	+
	PDA5	3	-	-
	PDA6	1	-	-
PALESEMA	P1	5	-	-
	P2	3	-	+
	P3	1	-	-
	P4	3	-	-
	P5	7	-	-
PALPAILON	PAL1	1	-	-
	PAL2	3	-	-
	PAL3	5	-	-
	PAL4	7	-	-
TABUCHE	T1	5	-	-
	T2	3	-	-
	T3	7	-	-
	T4	5	-	-

*Detecta todas las especies de *Phytophthora* presentes en la muestra (PathoScreen kit e ImmunoStrip test para *Phytophthora*, Agdia, Inc.)

4.4. Identificación de aislados bacterianos

4.4.1. Pruebas bioquímicas y de crecimiento

Se obtuvieron 29 aislados bacterianos desde las muestras de tejido colectado en las plantaciones de palma aceitera. Se seleccionaron 19 aislados (Tabla 11) que correspondieron a bacterias Gram negativas (Figura 13). Estos aislados no formaron pigmentos en YDC y no formaron fluorescencia en medio B de King. Los aislados tuvieron crecimiento a 37 °C. Ocho aislamientos presentaron una coloración púrpura luego de colocar una gota de solución acuosa 1% de metil-f-fenilendiamina en la colonia, considerándose una reacción positiva para la prueba de oxidasa (Figura 14). Cuatro colonias bacterianas en medio CVP formaron un cráter en el punto de siembra.

Según lo expuesto por Schaad et al., (2001), las bacterias del género *Erwinia* son tinción Gram negativa, de crecimiento anaeróbico, no forman colonias amarillas en medio YDC, ni colonias fluorescentes en medio KingB y son oxidasa negativa. *Erwinia amylovora*, *E. alni*, *E. nigrifluens*, *E. epsidii*, *E. pyrifoliae* y *E. tracheiphila* no degradan pectatos; mientras que *E. carotovora*, *E. paradisiaca*, *E. persicinus*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens* y *E. salicis* realizan degradación de pectatos (Schaad et al., 2001).

En el ensayo de maceración de tejidos en tubérculos de papa, cinco aislados a las 48 horas produjeron maceración del tubérculo. Sin embargo, la maceración de los tejidos no ocurrió con igual intensidad, los aislamientos 10, 11, 16 y 19 maceraron completamente el tejido a las 48 horas y se apreció bacterias secundarias, mientras que la maceración completa del tejido con los aislados 4 y 5 fue a las 72 horas. Los tubérculos del testigo inoculados con agua estéril no mostraron alteración alguna.

Los resultados señalan la presencia de aislamientos más virulentos que puede deberse a una secreción mayor de enzimas pectolíticas, de acuerdo a lo expuesto por Franco et al., (2004), quienes determinaron diferencia enzimática entre cepas de *Erwinia* sp. Igualmente Duarte et al. (2004) encontraron que aislamientos de *Erwinia* de papa de Brasil poseían una capacidad mayor

de maceración, y por consiguiente de patogenicidad, y causaron síntomas a las 72 horas en comparación con una cepa tipo de *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, que requirió de siete días.

Según Schaad et al., (2001), la habilidad de una bacteria para macerar tejidos de plantas confirma la naturaleza pectolítica y es un indicador de patogenicidad. La maceración de tejidos no es una prueba de la patogenicidad de la bacteria en el medio ambiente en el cual se desarrolla. Falsos positivos pueden ocurrir, debido a que en la naturaleza están presentes microorganismos endófitos o epifitos asociados con el tejido inoculado.

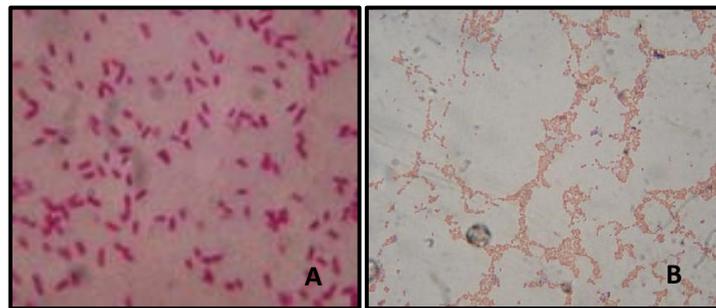


Figura 13. Tinción Gram de aislados bacterianos 11 y 27.

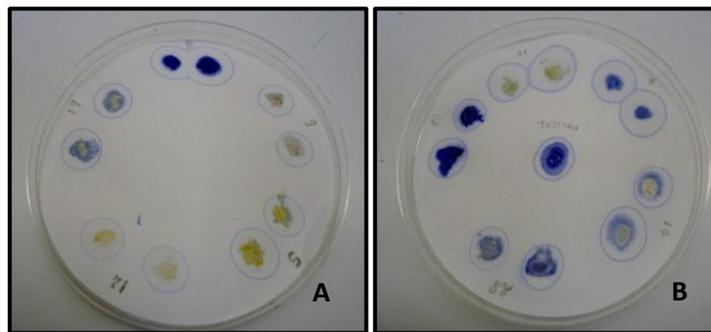


Figura 14. Prueba de la oxidasa. A) Resultado negativo, reacción de color amarillo; B) Resultado positivo, reacción de color púrpura.

Tabla 11. Características de los aislados obtenidos en palma aceitera con síntomas de PC.

Aislado	Tinción Gram	Pigmentos en YDC	Fluorescencia en King B	Crecimiento a 37 °C	Oxidasa	Degradación de pectatos	Maceración de tejidos
27	-	-	-	Si	+	-	-
13	-	-	-	Si	+	-	-
19	-	-	-	Si	-	+	+
11	-	-	-	Si	-	+	+
17	-	-	-	Si	+	-	-
5	-	-	-	Si	-	-	+
25	-	-	-	Si	-	+	-
8	-	-	-	Si	+	-	-
16	-	-	-	Si	-	-	+
28	-	-	-	Si	+	-	-
10	-	-	-	Si	+	+	+
9	-	-	-	Si	-	-	-
24	-	-	-	Si	+	-	-
12	-	-	-	Si	-	-	-
17	-	-	-	Si	+	-	-
29	-	-	-	Si	-	-	-
14	-	-	-	Si	+	-	-
4	-	-	-	Si	+	-	+
3	-	-	-	Si	+	-	-

4.4.2. Pruebas de serología para el género *Erwinia*

La prueba del inmunoblot para la identificación de *Erwinia carotovora*, mostró resultados positivos para los aislados 10, 19, 16 y 3 (Tabla 12) al producir una coloración púrpura en el punto de inoculación de la bacteria (Figura 15B). La prueba DAS ELISA para la identificación de *E. amylovora* fue positiva para los aislados 5, 25, 19, 11 y 29 (Tabla 12), el resultado positivo se determinó mediante la formación de una coloración amarilla en los pocillos que contienen la suspensión bacteriana (Figura 15A). La técnica DAS ELISA a pesar de su eficiencia y sensibilidad produjo reacción cruzada con el aislamiento 19, este aislado también fue positivo para *E. carotovora* (Tabla 12). De acuerdo con Champoiseau (2009), los métodos serológicos son generalmente rápidos y seguros pero sufren de problemas con la especificidad, la sensibilidad o los dos.

Tabla 12. Resultados de la prueba ELISA para la identificación de *Erwinia amylovora* e Inmunoblot para la identificación de *Erwinia carotovora*.

Aislado	DAS ELISA <i>E. amylovora</i>	Inmunoblot <i>E. carotovora</i>
14	-	-
5	+	-
25	+	-
13	-	-
10	-	+
17	-	-
8	-	-
16	-	+
19*	+	+
11	+	-
3	-	+
29	+	-
4	-	+
9	-	-
27	-	-
C-	-	-
C+	+	+

*Reacción cruzada, positivo en las dos especies.

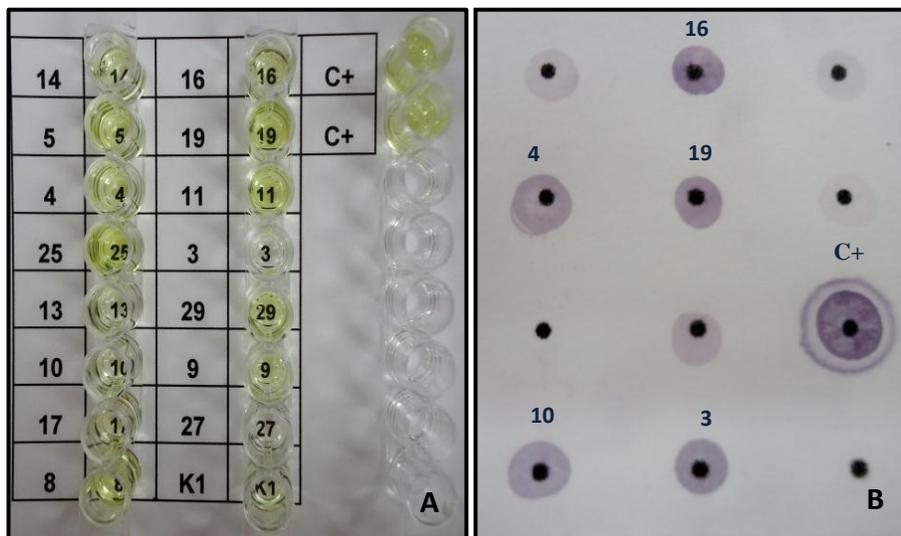


Figura 15. Resultados de las pruebas de serología realizadas a los aislados de *E. amylovora* y *E. carotovora*. A) DAS ELISA para *E. amylovora* y B) Inmunoblot para *E. carotovora*.

4.4.3. Reacción de hipersensibilidad de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

Con los aislados 5, 25, 10, 19, 16, 11, 3 y 4 que resultaron positivos para el *E. amylovora* y *E. carotovora* en las pruebas DAS ELISA e inmunoblot respectivamente se realizó la prueba de reacción de hipersensibilidad (HR) en plantas de tabaco (Tabla 13). En esta prueba todas las hojas infiltradas con la suspensión de los aislados 10, 11, 16 y 19 mostraron una necrosis parcialmente desecada y con un halo de color amarillo alrededor de la lesión a las 48 horas (Figura 16). Ninguna lesión fue observada en aquellas plantas que se inocularon con agua estéril. Las plantas de tabaco se utilizan con frecuencia en pruebas de HR ya que posee hojas con grandes espacios intervenales que permite realizar fácilmente infiltraciones de una suspensión de bacterias. El tejido se vuelve sensible al patógeno, lo que resulta en una muerte rápida de las células vegetales locales, y la inmovilización del agente patógeno. El colapso del tejido en el punto de inoculación dentro de las 48 horas indica que probablemente la bacteria sea un patógeno de otro hospedero (Vidaver and Lambrecht, 2004).

Tabla 13. Resultados de la prueba de reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco con nueve aislados bacterianos.

No. Aislado	HR
19	+
11	+
3	-
5	-
25	-
8	-
16	+
4	-
10	+



Figura 16. Reacción de hipersensibilidad a las 48 horas después de la inoculación de aislados de *Erwinia* spp. A) Punto de inoculación; B) y C) Necrosis en el punto de inoculación con los aislados 11 y 16.

4.4.4. Producción de ácidos a partir de carbohidratos

Con los aislados bacterianos 10 (*E. carotovora*), 11 (*E. amylovora*), 16 (*E. carotovora*) y 19 (*E. amylovora*) que resultaron positivos en la prueba de reacción de hipersensibilidad se determinó la capacidad de producir ácido a partir de seis fuentes de carbohidratos: maltosa, celobiosa, manitol, sorbitol, dulcitol y trehalosa.

Los resultados a los 2, 4, 6, 21 y 28 días de evaluación (Apéndice 10) demuestran que los aislados no produjeron ácido a partir de los carbohidratos, es decir; no hubo cambio en la coloración del medio de púrpura a amarillo (Figura 17), se observó una ligera variación en el color original del medio base, este cambio no se consideró como positivo en la producción de ácido, ya que Schaad et. al. (2001), indica que un resultado se considera positivo cuando el medio cambia a color amarillo. Los resultados obtenidos no concuerdan con lo publicado por Martinec and Kocur (1964), los autores indican que *Erwinia amylovora* forma ácido a partir de

las fuentes sorbitol, manitol y trehalosa. Mientras que Schaad et. al, (2001), indica que *Erwinia carotovora* no produce ácido a partir de Sorbitol. Se debería complementar la identificación de la especie de *Erwinia* con pruebas moleculares. En este ensayo no se pudo concluir sobre la presencia de *Erwinia amylovora*, se requerirán pruebas adicionales. Uno de los factores que disminuye la eficiencia de las pruebas de serología es la reacción cruzada, esta ocurre cuando moléculas análogas al sustrato pueden detectarse y enlazarse con anticuerpos específicos, creando una respuesta no específica. Por ello, se sugiere realizar la prueba ELISA varias veces utilizando la misma muestra o realizar un ensayo previo para estandarizar la prueba (Limpton et al., 2000. Citado por Romero, 2012).



Figura 17. Medio C de Dye con seis fuentes de cargohidratos. No se observó producción de ácidos con los aislados bacterianos 10, 11, 16 y 19.

4.4.5. Identificación molecular de aislados bacterianos

Se realizó la identificación molecular de los 4 aislados seleccionados que resultaron patógenos en la prueba de reacción de hipersensibilidad (Tabla 13) y que presentaron características morfológicas similares a *Erwinia* spp. En todos los aislados se obtuvo una banda de ADN con aproximadamente 1400 pb del gen de la fracción 16S del rRNA producto de la amplificación con los cebadores 27f y 1492r (Figura 18) correspondiente correspondiente con el peso molecular reportado para el dominio bacteria con el uso de cebadores universales (Álvarez, 2012).

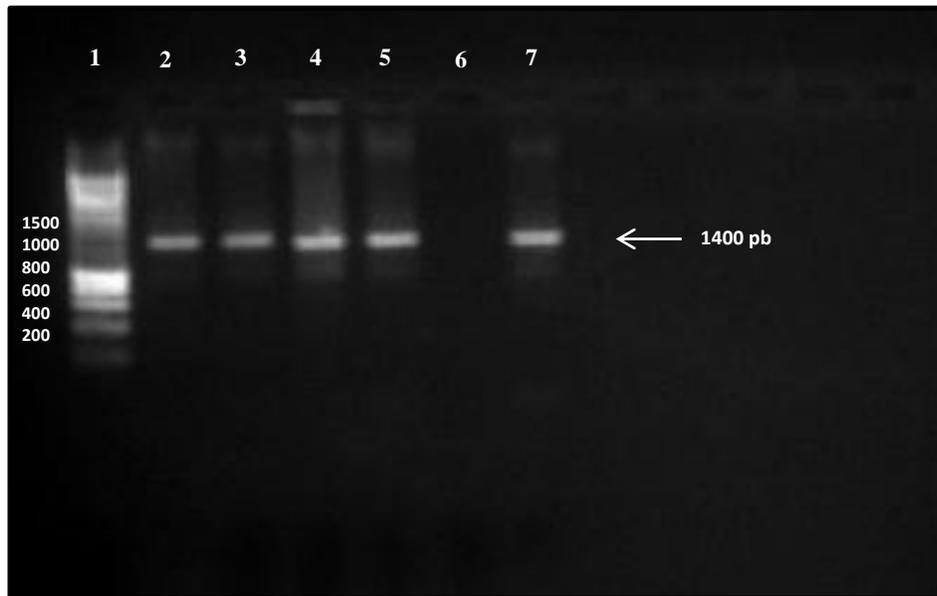


Figura 18. Gel de agarosa al 1% con productos de la amplificación de la región 16S de ARN ribosomal de 500 pb de *Fusarium* spp. Carril. Carril 1: marcador 1 kb. Carril 2-5 aislados bacterianos 10, 19, 16 y 11. Carril 6 y 7 control negativo y positivo.

4.5. Ensayo de patogenicidad con *Erwinia carotovora* y *E. amylovora*

Se inocularon palmas de vivero con los aislados de *Erwinia* spp. (Tabla 3), se incluyó un testigo inoculado con agua estéril. Después de dos meses de la inoculación, los datos indican que no se manifestaron síntomas en las plantas inoculadas con los aislados de *Erwinia* spp. (Tabla 14). Después de dos meses de evaluación las plantas inoculadas no mostraron síntomas (Figura 19). Los resultados de la investigación concuerdan con lo citado Franqueville (2001), el autor indica que *Erwinia* es considerada como un agente secundario cuya inoculación, nunca ha permitido la obtención de los síntomas de la PC. Sin embargo, Duff (1963) citado por Franqueville (2001), obtuvo los síntomas de la pudrición en plantas jóvenes de palma aceitera después de haber inducido un choque fisiológico provocando un retardo en el crecimiento, este trabajo no fue continuado.

Por otro lado Quillec *et al.*, (1984) citado por Franqueville (2001), indica que la acción de las bacterias en la PC es principalmente saprófita, pero muy rápidamente siguen la dispersión de *Phytophthora* que causa la maceración de los tejidos, estado al cual el agente primario, cuya acción es muy fugaz, desaparece y se pone particularmente difícil de aislar.

Tabla 14. Número de plantas inoculadas con *Erwinia amylovora* y *E. carotovora* con y sin síntomas.

Aislado	Bacteria	No. Plantas	Severidad
10	<i>Erwinia carotovora</i>	6	1
11	<i>Erwinia amylovora</i>	6	1
16	<i>Erwinia amylovora</i>	6	1
19	<i>Erwinia carotovora</i>	6	1
Testigo	Agua estéril	6	1
Total		30	1



Figura 19. Plantas inoculadas con el aislado 10 de *E. carotovora*. A) Sin síntomas visibles; B) Lesiones causadas por la herida al momento de la inoculación.

4.6. Ensayo de patogenicidad con *Fusarium oxysporum* y *F. solani*

En el material susceptible CIRAD código 2504 con el aislado 70 inoculado con *F. oxysporum* y el aislado 12 inoculado con *F. solani*, y los aislados combinados 70+12 inoculado con *F. oxysporum* y *F. solani*, 70+69 inoculado con *F. oxysporum* y *Fusarium* sp. y 62+12 inoculado con *Fusarium* sp. y *F. solani* presentaron diferencias al ser comparadas con el control (Tabla 15).

Las plantas inoculadas con el aislado 70 de *Fusarium oxysporum* presentaron síntomas de necrosis en la hoja más joven después de 4 días de la inoculación. Los síntomas se manifestaron con severidad 3: amarillamiento de las hojas, pequeñas lesiones en la hoja más joven. Después de 27 días de la inoculación los síntomas progresaron a amarillamiento de hojas, pudrición de la hoja más joven sin descender al cogollo (Figura 20).

Luego de dos meses los síntomas no progresaron, incluso hubo emisión de hojas nuevas. Sin embargo, el hecho que el hongo cause lesiones y pudrición descendente en la hoja más joven demuestra la patogenicidad de *F. oxysporum*.

F. oxysporum está asociado a la PC de la palma de aceite en el Ecuador y puede ser importante en el desarrollo de la enfermedad. Es probable que la PC en el Ecuador sea un complejo en el que intervienen varias especies de hongos, entre ellos *Fusarium*, para que la enfermedad resulte letal. En Ecuador, Chávez (1974) en la Estación Experimental Santo Domingo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP) concluyeron que *Fusarium oxysporum*, y *F. roseum* estaban asociados con la PC.

Las plantas inoculadas con el aislado 12 de *Fusarium solani* presentaron síntomas de necrosis en la hoja más joven con amarillamiento de las hojas. Los síntomas no progresaron en el transcurso de los dos meses de evaluación (Figura 21). En Sibiti, en el Congo-Brazzaville, Bachy (1954), citado por de Franqueville (2001) reportó una fuerte asociación entre la pudrición del cogollo, las bacterias y los *Fusarium*, principalmente *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. roseum*.

En contraste, según lo publicado por de Franqueville (1998), que inoculó *Fusarium*, a nivel del suelo, en la fase de plántula. Unos meses después, mitad de las plantas inoculadas recibieron una suspensión bacteriana a nivel de la flecha. Este ensayo está basado en la hipótesis de un origen del suelo de la PC, causado por las formas hipovirulentas del *Fusarium*, migrando hacia el cogollo de manera sistémica, y favoreciendo el desarrollo bacteriano. La inoculación artificial de especies de *Fusarium* ha terminado sin resultados, los síntomas de la PC no han podido ser reproducidos (de Franqueville, 2001).

Tabla 15. Promedio de la severidad luego de la inoculación de *Fusarium* spp. en material susceptible CIRAD código 2504.

Aislado	Hongo	No. Plantas	Severidad
12	<i>F. solani</i>	3	3
28	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
30	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
31	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
37	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
51	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
65	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
69	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
70	<i>F. oxysporum</i>	3	5
87	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
90	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
95	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
70+12	<i>Fusarium</i> spp.	3	3
70+69	<i>Fusarium</i> spp.	3	3
62+12	<i>Fusarium</i> spp.	3	3
69+87	<i>Fusarium</i> spp.	3	1
Testigo	Agua estéril	3	1

Por otra parte, los tratamientos combinados de *F. oxysporum* y *F. solani*, presentaron amarillamiento de las hojas y lesiones necróticas en la hoja más joven y no progresaron durante el periodo de evaluación (Figura 22).



Figura 20. Pruebas de patogenicidad con el aislado 70 de *F. oxysporum* en palmas CIRAD código 2504. A y B) Necrosis en la hoja más joven después de 4 días de la inoculación; C y D) Pudrición descendente de la hoja más joven después de 27 días de la inoculación.

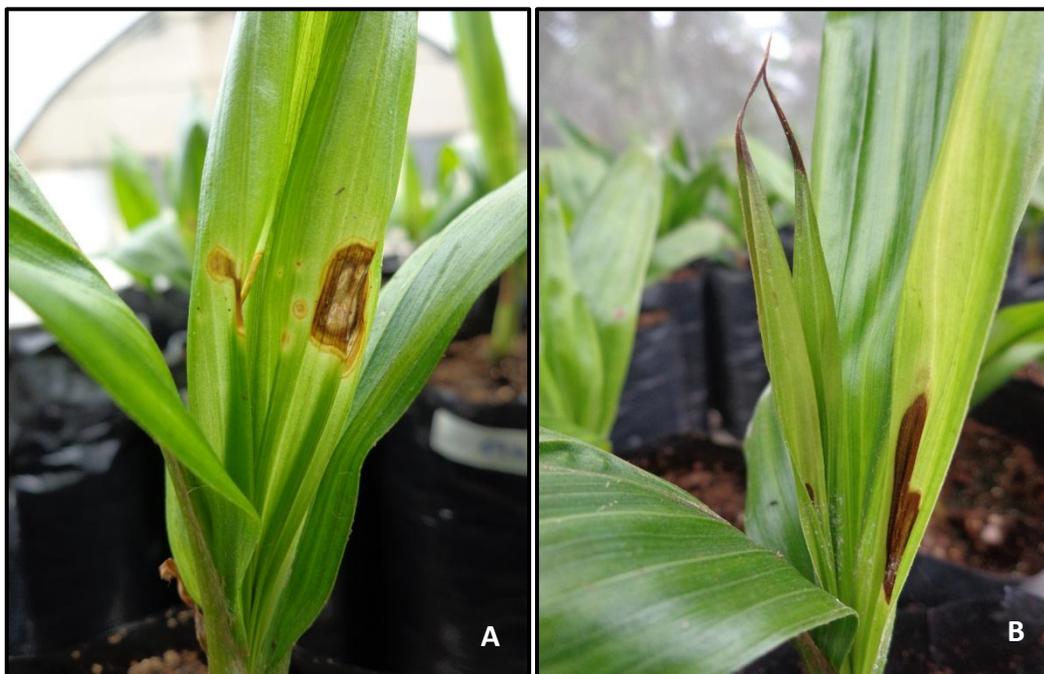


Figura 21. Pruebas de patogenicidad con el aislado 12 de *F. solani* en palmas CIRAD código 2504. A) Necrosis en la hoja más joven después de 4 días de la inoculación; B) Pudrición descendente de la hoja más joven después de 27 días de la inoculación.

El efecto de la inoculación combinada de estos patógenos no fue letal en las plantas, sin embargo los síntomas se observaron a los 4 días de la inoculación. Según Chinchilla (2010), las pudriciones del cogollo, no son necesariamente letales, y una proporción variable de las plantas (que puede ser cercana a 100%) puede recuperarse de los síntomas. La severidad de los síntomas, la velocidad de recuperación y la proporción de plantas que se recuperan normalmente dependen del sitio escogido para hacer la plantación y su historial de manejo agronómico, incluyendo la preparación del terreno y las prácticas de siembra.



Figura 22. Pruebas de patogenicidad con los aislados 70 y 12 de *F. oxysprum* y *F. solani* en palmas CIRAD código 2504, necrosis de la hoja más joven 4 días después de la inoculación. A) Inoculación con los aislados 8+9 de *Fusarium* sp. y *F. oxysporum*; B) Inoculación con los aislados 1+9 de *F. solani* y *F. oxysporum*.

En material tolerante “híbrido O x G” únicamente el aislado 70 de *F. oxysporum* mostró síntomas de necrosis en la hoja nueva (Tabla 16). Estos síntomas fueron ubicados en el grado 3 dentro de la escala de severidad. Durante el periodo de evaluación no se notó progresión de los síntomas, la emisión de hojas nuevas en las plantas inoculadas fue un indicativo de que las plantas se encontraban aparentemente sanas al final de la evaluación (Figura 23). Las lesiones causadas por *F. oxysporum* en material CIRAD código 2504 y en material tolerante “híbrido” fueron diferentes. Mientras que *F. oxysporum* causó síntomas de grado 5 en la escala de severidad en material CIRAD, en el “híbrido O x G” fueron de grado 3. Según lo publicado por Chinchilla (2010), la especie *E. oleifera* es una fuente importante de tolerancia a las pudriciones del cogollo, y esta característica puede ser combinada con los genes de *E. guineensis* para obtener los híbridos O x G, que han sido plantados en sitios previamente afectados por la PC con

un grado variable de éxito. Además, en el Oriente Ecuatoriano de Franqueville (2001), pudo constatar esporádicamente la presencia de síntomas de la PC en los híbridos interespecíficos O x G. El mismo autor concluye que tal tolerancia podría corresponder a la formación de una barrera de cicatriz encima del meristema que bloquearía la progresión de la pudrición.

Tabla 16. Promedio de la severidad luego de la inoculación de *Fusarium* spp. en material híbrido interespecífico O x G.

Aislado	Hongo	No. Plantas	Severidad
12	<i>F. solani</i>	3	1
28	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
30	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
31	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
37	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
51	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
65	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
69	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
70	<i>F. oxysporum</i>	3	3
87	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
90	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
95	<i>Fusarium</i> sp.	3	1
70+12	<i>Fusarium</i> spp.	3	1
70+69	<i>Fusarium</i> spp.	3	1
62+12	<i>Fusarium</i> spp.	3	1
69+87	<i>Fusarium</i> spp.	3	1
Testigo	Agua estéril	3	1



Figura 23. Pruebas de patogenicidad con el aislado 70 de *F. oxysporum* en material tolerante “híbrido”. A) Necrosis en la hoja más joven después de 4 días de la inoculación; B) Pudrición descendente de la hoja más joven después de 27 días de la inoculación.

4.7. Reaislamiento de *F. oxysporum* y *F. solani* desde plantas inoculadas

De las plantas inoculadas con el aislado 70 de *F. oxysporum* y el aislado 12 de *F. solani* se obtuvieron los mismos hongos luego del reaislamiento de los hongos inoculados. El estudio de las características morfológicas demuestran que los aislamientos realizados a partir de tejido infectado correspondió a *F. oxysporum* y *F. solani* (Figura 24).

En esta investigación se comprobó la patogenicidad de *F. oxysporum* y *F. solani* al ser inoculados en plantas de palma aceitera de 2 meses de edad y causar lesiones necróticas y pudrición descendente de la hoja más joven. Un nuevo aislamiento desde tejido sintomático producto de la inoculación y estudiar las características morfológicas, corroboró la presencia de *F. oxysporum* y *F. solani* en el tejido. Según Agrios (2005), los postulados de Koch comprueban

la hipótesis de que el patógeno es la causa de la enfermedad y para ello es importante que el patógeno sea aislado una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder al patógeno inoculado.

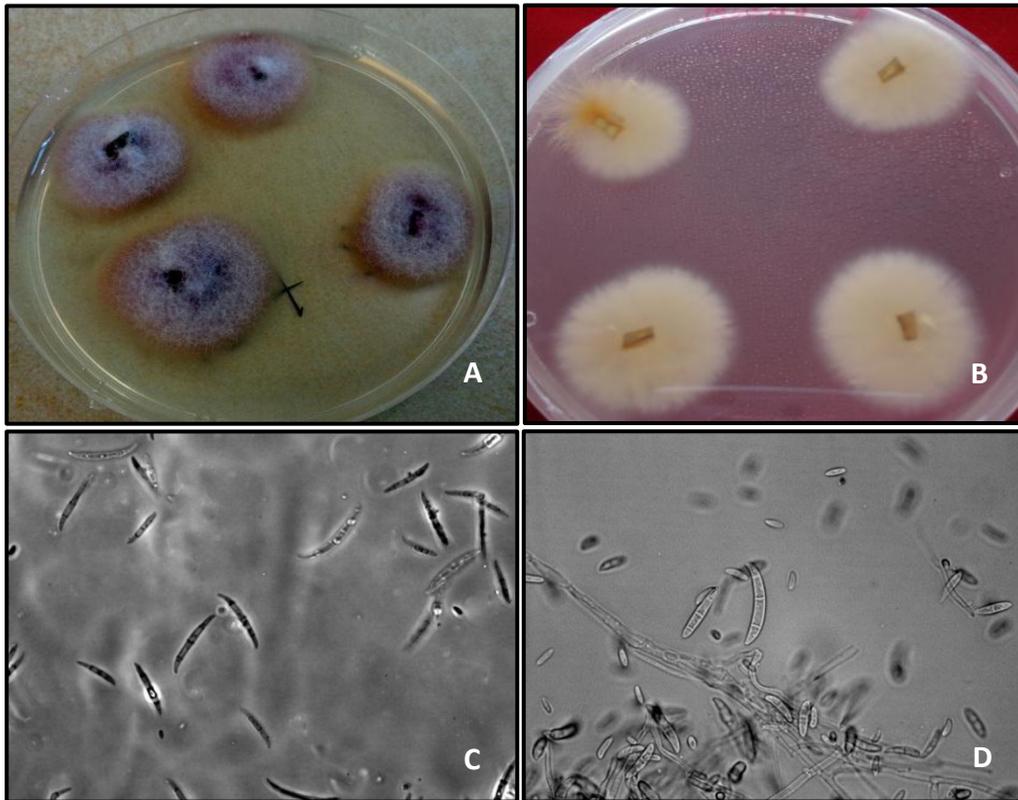


Figura 24. Reaislamiento en medio APDA de *F. oxysporum* y *F. solani*. A) Crecimiento de *F. oxysporum* desde tejido inoculado; B) Crecimiento de *F. solani* desde tejido inoculado; C) Macroconidias de *F. oxysporum* y D) Macroconidias y microconidias de *F. solani*.

Con los cultivos puros de *F. oxysporum* y *F. solani* se realizó una vez más, la amplificación de la región intergénica ITS mediante PCR y los cebadores ITS1 e ITS4. Esta caracterización permitió identificar a nivel molecular a *F. oxysporum* y *F. solani*. Se amplificó fragmentos de 500 pares de bases de acuerdo a lo reportado por Abd-Elsalam (2003), para la amplificación de la región ITS con cebadores universales (Figura 25).

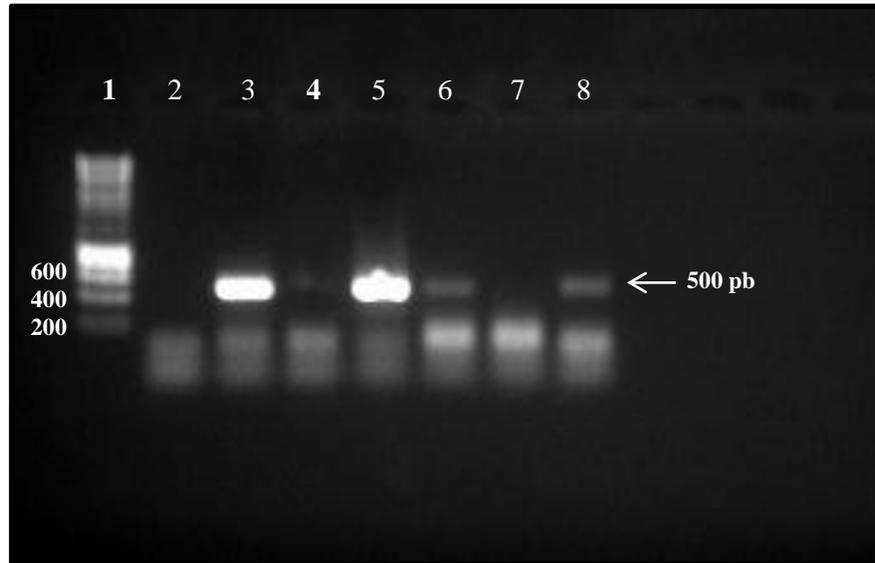


Figura 25. Gel de agarosa al 1% de *F. oxysporum* y *F. solani* aislado desde tejido inoculado en palmas de vivero. Carril 1: marcador 1kb; Carril 3: aislado 9 de *F. oxysporum*; Carril 5: aislado 1 de *F. solani*; Carril 7 y 8: Control negativo y positivo.

4.8. Propiedades del suelo y la severidad de la PC

Los resultados del análisis de las propiedades químicas del suelo de las plantaciones de palma aceitera muestreadas en la Provincia de San Lorenzo se presentan en la Tabla 16. El análisis de la correlación lineal simple fue significativo para la concentración de fósforo (P), cobre (Cu), hierro (Fe) y materia orgánica (MO) en el suelo. Los coeficientes de correlación fueron: P (0.33), Cu (0.34), Fe (0.39) y MO (0.43) (Tabla 17). De acuerdo con Silva (2008), la significación de la correlación lineal simple depende del número de pares de observaciones, mientras mayor es el número, mayor es la probabilidad de obtener significancia.

Tabla 17. Resultados de análisis de las propiedades químicas del suelo en palmas con distintos grados de severidad.

Identificación	Escala de Severidad	pH	ppm			meq/100 ml			ppm					meq/100 ml			%	meq/100 ml				ppm
			NH4	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B	Al+H	Al	MO	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	Σ Bases	Cl	
A1	3	5.70	28.00	6.30	8.70	0.08	3.50	0.83	1.30	1.50	155.00	14.40	0.70	0.70	2.30	4.22	10.38	54.13	5.11	53.30		
A2	7	4.85	47.00	7.70	8.90	0.17	3.40	0.82	2.10	2.90	287.00	23.50	0.60	1.70	0.60	4.20	4.15	4.82	24.82	6.09	142.00	
A3	1	4.86	35.00	6.30	5.70	0.1	3.90	1.00	0.60	1.70	197.00	17.90	0.60	2.70	0.70	2.60	3.90	10.00	49.00	7.70	79.90	
A4	5	4.63	41.00	6.30	6.30	0.08	4.40	1.00	0.80	3.10	275.00	11.90	0.50	5.00	2.30	3.30	4.40	12.50	67.50	10.48	181.10	
A5	3	4.72	38.00	7.90	20.00	0.09	3.40	1.20	1.00	1.90	157.00	11.80	0.60	1.80	0.60	2.50	2.83	13.33	51.11	6.49	138.50	
A6	5	5.40	43.00	8.60	13.00	0.22	6.70	0.90	1.10	1.70	204.00	11.40	0.60	0.50	3.30	7.44	4.09	34.55	8.32	177.50		
AL1	7	4.87	44.00	12.00	13.00	0.09	2.40	0.50	1.20	1.50	184.00	66.60	1.50	1.20	0.50	2.40	4.80	5.56	32.22	4.79	115.40	
AL2	1	5.44	30.00	7.70	16.00	0.27	4.60	0.77	1.20	2.40	114.00	64.20	0.80	0.40	2.20	5.97	2.85	19.89	6.04	106.50		
AL3	3	4.32	27.00	13.00	26.00	0.25	1.10	0.37	0.80	3.40	168.00	8.30	0.80	4.50	2.00	1.70	2.97	1.48	5.88	6.22	106.50	
AL4	5	4.34	32.00	62.00	28.00	0.34	2.20	0.64	0.80	2.70	191.00	19.80	1.30	3.40	1.30	2.10	3.44	1.88	8.35	6.58	160.90	
K1	3	4.45	65.00	9.30	6.50	0.21	0.92	0.28	1.70	2.10	305.00	105.00	0.70	3.20	0.90	4.40	3.29	1.33	5.71	4.61	168.60	
K2	5	4.82	22.00	7.00	9.70	0.32	2.70	0.95	2.10	3.00	167.00	6.30	0.70	1.80	0.50	2.40	2.84	2.97	11.41	5.77	88.80	
K3	7	4.62	32.00	7.40	14.00	0.19	3.40	1.20	2.60	6.60	192.00	16.80	0.60	3.80	1.30	3.00	2.83	6.32	24.21	8.59	74.60	
K4	1	5.10	24.00	3.50	11.00	0.13	4.30	1.20	1.30	3.20	155.00	23.60	0.60	1.10	0.50	2.80	3.58	9.23	42.31	6.73	94.10	
PDA1	5	4.50	240.00	14.00	121.00	1.20	3.40	1.10	3.20	4.90	215.00	153.80	5.80	1.40	0.50	3.20	3.09	0.92	3.75	7.10	257.40	
PDA2	5	5.26	720.00	65.00	68.00	1.80	1.60	0.82	3.10	5.00	175.00	99.80	3.90	1.70	1.10	2.40	1.95	0.46	1.34	5.92	417.10	
PDA3	5	6.18	99.00	62.00	24.00	2.20	5.90	2.80	6.00	7.10	289.00	68.40	0.90	5.30	2.11	1.27	3.95	10.90	310.60			
PDA4	1	5.73	25.00	18.00	20.00	1.10	3.20	2.10	1.90	3.00	112.00	28.40	0.70	2.20	1.52	1.91	4.82	6.40	159.80			
PDA7	3	4.63	41.00	7.90	12.00	0.59	1.50	0.47	1.50	2.50	228.00	28.80	0.70	2.40	1.00	3.00	3.19	0.80	3.34	4.96	145.60	
PDA8	1	5.27	30.00	5.10	7.90	0.31	4.60	1.70	3.30	2.70	107.00	34.90	0.70	0.60	2.00	2.71	5.48	20.32	7.21	94.10		
PDA9	5	4.46	63.00	18.00	10.00	0.27	1.60	1.00	1.70	2.10	271.00	34.50	0.60	2.00	0.60	4.70	1.60	3.70	9.63	4.87	124.00	
PDA10	1	5.68	27.00	4.20	2.20	0.32	3.70	0.93	1.70	1.90	99.00	57.30	0.80	2.00	3.98	2.91	14.47	4.95	106.50			
P1	5	5.24	33.00	11.00	8.20	0.31	4.40	1.30	2.90	2.40	186.00	48.70	0.80	0.5	2.60	3.38	4.19	18.39	6.51	97.60		
P2	3	4.71	30.00	21.00	12.00	0.65	3.30	1.10	1.70	2.60	194.00	40.30	1.10	1.5	0.50	2.30	3.00	1.69	6.77	6.55	168.60	
P3	1	5.1	36.00	5.10	8.20	0.54	3.20	0.85	1.70	2.00	173.00	57.40	0.80	1.1	0.40	2.40	3.76	1.57	7.50	5.69	97.60	
P4	3	4.58	40.00	8.40	10.00	0.28	1.80	0.50	1.20	2.00	242.00	58.10	0.80	1.7	0.60	3.20	3.60	1.79	8.21	4.28	150.90	
P5	7	4.63	42.00	5.10	9.70	0.11	2.50	0.47	1.30	2.00	247.00	27.70	0.70	2.5	0.90	2.90	5.32	4.27	27.00	5.58	97.60	
PAL1	1	4.51	36.00	30.00	15.00	0.24	1.60	0.40	2.00	2.10	176.00	36.70	3.40	1.8	0.40	1.80	4.00	1.67	8.33	4.04	106.50	
PAL2	3	4.71	30.00	24.00	15.00	0.34	2.20	0.56	1.60	2.10	154.00	39.70	3.20	1.2	0.50	1.80	3.93	1.65	8.12	4.30	168.60	
PAL3	5	4.2	32.00	74.00	26.00	0.69	1.30	0.40	1.10	1.40	227.00	17.40	1.10	2.6	0.50	2.20	3.25	0.58	2.46	4.99	213.00	
PAL4	7	4.51	60.00	53.00	12.00	1.10	3.20	0.76	2.10	3.80	249.00	58.30	1.70	1.1	0.50	3.30	4.21	0.69	3.60	6.16	248.50	
T1	5	6.31	23.00	43.00	4.20	1.30	17.10	2.40	2.20	3.60	95.00	12.10	0.90	2.50	7.13	1.85	15.00	20.80	88.80			
T2	3	5.98	21.00	25.00	4.00	0.71	16.40	2.30	1.50	4.40	137.00	11.20	0.80	2.10	7.13	3.24	26.34	19.41	115.40			
T3	7	5.78	28.00	38.00	6.10	0.92	17.00	2.30	2.80	4.20	133.00	17.40	0.80	3.30	7.39	2.50	20.98	20.22	97.60			
T4	5	6.43	24.00	39.00	2.60	1.10	17.30	2.20	1.70	3.50	68.00	16.50	0.80	3.00	7.86	2.00	17.73	20.60	97.60			

Tabla 18. Coeficientes de correlación de la severidad y la concentración de nutrientes en el suelo.

Elemento	N	Pearson	p-valor
pH	35	-0.10	0.5783
NH ₄	35	0.15	0.3920
P	35	0.33	0.0507
S	35	0.13	0.4741
K	35	0.19	0.2727
Ca	35	0.17	0.3204
Mg	35	0.05	0.7637
Zn	35	0.21	0.2223
Cu	35	0.34	0.0439
Fe	35	0.39	0.0201
Mn	35	-0.01	0.9364
B	35	0.06	0.7459
Al+H	28	0.20	0.2999
Al	23	0.16	0.4664
MO	35	0.43	0.0101
Ca/Mg	35	0.20	0.2381
Mg/K	35	-0.09	0.5977
Ca+Mg/K	35	-0.02	0.9232

Significancia para p_ valor <0.05

Según Chinchilla (2010), la presencia de la PC ha sido asociada con baja concentración de Zn y Cu, un desequilibrio en la relación Mn/Fe, baja concentración de boro y la incapacidad de la planta de obtener el calcio en periodos críticos del desarrollo de los puntos de crecimiento, pero estas relaciones no son siempre claras. Según el mismo autor, recientemente, se ha sugerido la asociación entre una alta saturación de aluminio (Al) en el suelo y la PC, aunque en condiciones naturales con frecuencia la palma aceitera crece en suelos fuertemente ácidos con un alto nivel de ese elemento. En esta investigación, el análisis de correlación entre la severidad de la PC y el contenido de Al fue no significativo.

Ensayos de nutrición mineral realizados en Ecuador en los años ochenta no mostraron ningún efecto significativo que permitan relacionar el efecto de la fertilización y la PC (Franqueville, 2001). Por otro lado, en 1988 en Brasil, mostraron que no había ningún efecto de

la fertilización en el desarrollo de la enfermedad y que N, P, K, Mg o Ca no intervinieran en la predisposición de la planta a PC (Van Slobbe, 1996. Citado por Franqueville, 2001).

En Colombia, Acosta y Múnevar (2005) resaltan la importancia del buen manejo del suelo para controlar la PC. Recomiendan un manejo preventivo que incluya establecimiento de drenaje y fertilización balanceada.

En la plantación Aiquisa, el análisis de suelo del lote 8A indica que el nivel de P fue bajo, este se encontró entre 6.30 y 8.60 ppm. De igual manera, el K estuvo en baja concentración, entre 0.08 y 0.17 meq/100 (Apéndice 11). La baja concentración de P y K en las muestras analizadas fue tanto en plantas sanas como enfermas, es decir el contenido de P y K en las muestras analizadas fue independiente del grado de severidad. Franqueville (2001), propone que los macronutrientes no tienen efecto en el desarrollo de la PC, pero que los microelementos están involucrados en su aparición. Respecto a la concentración de Al, en una palma con grado 5 el Al se encontró en niveles tóxicos (2.30 meq/100), mientras que en otras palmas sanas y enfermas el Al estuvo en nivel medio (Apéndice 11). Laing (2009), sugiere que un factor edáfico asociado con la incidencia de la PC es la alta concentración de aluminio en los primeros 20 cm del suelo.

En la plantación Kayalú, en el sitio de muestreo se encontró pH ácido y baja concentración de P y K en todas las palmas muestreadas. Además, la concentración de Ca fue baja en plantas con grado 3, 5 y 7. Por otro lado, la concentración de hierro (Fe) fue alta para todas las palmas muestreadas. Respecto a la concentración de Al, los niveles fueron tóxicos para palmas enfermas, este mismo elemento se encontró en nivel medio en palmas sanas (Apéndice 12).

En el lote HO7B de la plantación Palmeras de los Andes, los análisis de suelo indican que los niveles en la concentración de nutrientes como: P, K, Ca y Mg varían en todas las palmas muestreadas con distinto grado en la escala de severidad. De igual manera la concentración de Al fue diferente en todas las palmas muestreadas. Resaltan la alta concentración de Fe y Mn tanto en palmas sanas como enfermas (Apéndice 13).

En la plantación Alespalma, el lote muestreado tuvo suelos con pH ácido, niveles bajos de Mg y Zn, y alta concentración de Fe en todas las muestras analizadas (Apéndice 14). Algo similar se observó en los análisis de la plantación Palesema, en donde el lote muestreado presento pH ácido, baja concentración de Ca, Mg y Zn, y alta concentración de Fe y Mn en las muestras analizadas con distinto grado en la severidad. (Apéndice 15).

De igual manera en la plantación Palpailón, los análisis indican pH ácido en lote muestreado, baja concentración de Ca, Mg y alta concentración de Fe y Mn en las muestras analizadas (Apéndice 16). Lo contrario ocurre en la plantación Tabuche, en Quindé, los análisis muestran alta concentración de P y K, baja concentración de S y alta concentración de Ca, Mg y Fe en las muestras analizadas. Esto ocurre en palmas sanas y enfermas (Apéndice 17).

Los análisis de las propiedades químicas del suelo, indican que la severidad no fue relacionada con la concentración de nutrientes en el suelo como: P, K, Ca, Mg, Mn y Fe. La alta o baja concentración de estos elementos se encuentra tanto en palmas sanas como en palmas enfermas. Chinchilla 2010, indica que algunas características podrían estar presentes en una palma estresada y que la predisponen a la PC, principalmente la baja disponibilidad de K, cambios en las gradientes de nutrientes en los tejidos, particularmente K, Ca y la relación N/K, posibles relaciones desfavorables Fe/Mn y entre otros elementos (bajo Cu y Zn) y posible deficiencia inducida de Ca (alteración de corriente de transpiración). El mismo autor indica que no necesariamente elementos como K, Ca, Fe, Mn, Cu y Zn estarán siempre presentes en una planta predispuesta, esto podría variar con la presencia de otros elementos.

5. CONCLUSIONES

- *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* se aisló con mayor frecuencia (36.59%) desde tejido de flecha, bases peciolares y raíz con síntomas de PC.
- No se aisló a *Phytophthora* desde tejido de flecha y raíz.
- Las pruebas morfológicas, bioquímicas y de serología, indican que cuatro aislados bacterianos (10, 11, 16, 19) corresponden al género *Erwinia*.
- Los aislados 70 y 12 correspondientes a *F. oxysporum* y *F. solani* respectivamente causaron lesiones necróticas en la hoja más joven de palmas código 2504 cuatro días después de la inoculación, sin llegar a causar la muerte de la planta.
- El aislado 70 de *F. oxysporum* causó lesiones necróticas pequeñas en la hoja más joven del híbrido interespecífico O x G en comparación con el material CIRAD código 2504.
- La inoculación de *Erwinia* spp en palmas de vivero no mostró síntomas de la enfermedad.
- El análisis de la correlación lineal simple fue significativo para la concentración de fósforo (P), cobre (Cu) y hierro (Fe) en el suelo.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar nuevos muestreos en las plantaciones del Cantón San Lorenzo para determinar la presencia de *Phytophthora* spp.
- Realizar pruebas de patogenicidad con el aislado de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y los aislados de *Erwinia* spp. en la zona de San Lorenzo.
- Determinar la concentración de nutrientes en palmas con y sin síntomas de PC con análisis foliar.

7. LITERATURA CITADA

- Abd-El salam K, Aly I, Abdel-Satar M, Khalil M, Verreet J. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Afr. J. Biotechnol.* 2(4):82-85.
- Acosta A, Múnevar F. 2005. Efecto de las propiedades físicas y el contenido de nutrientes en el suelo en la pudrición del cogollo en palma aceitera. *Informaciones agronómicas de Hispanoamérica* 59:16.
- Agrios G. N. 2005. *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic Press, USA. p. 921
- Álvarez L, López P, Ruiz M, Royo G. 2012. Infección por *Actinobaculum schaalii*, *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 30(8): 505-506.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. APS Press. p. 218.
- Bastidas E, Enríquez G. 2008. Caracterización morfológica de palmas de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) enfermas con pudrición de cogollo en la zona palmera occidental. Tesis. Universidad de Nariño. p. 78.
- Bernal F. 2001. El cultivo de la palma de aceite y su beneficio: Guía para el nuevo palmicultor. Fedepalma y Cenipalma, Colombia. p. 12.
- Calvache H, Guevara L, Alvanil F. 1995. Anillo rojo hoja corta en palma de aceite. CENIPALMA. Boletín técnico 9:22.
- Castellanos G, Jara C, Mosquera G. 2011. Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos de frijol. *CIAT 375*: 23-24.
- Chávez, F. 1986. Enfermedades de la palma africana en Ecuador y su nombre. INIAP. Manual No. 8. p. 19.
- Champoiseau P. 2009. *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2. Universidad de Florida. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos – Programa de Iniciativa Nacional de Investigaciones. p. 15.
- Censo Palmero. 2005. Asociación Nacional de Palma Aceitera (ANCUPA), Fundación de Fomento de Exportaciones de Aceite de Palma y sus Derivados de Origen Nacional (FEDEPAL), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Sistema de Información Geográfica y Agropecuaria (SIGAGRO).

- Chinchilla C. 1997. Epidemiología y manejo integrado del anillo rojo en palma aceitera. *Agronomía costarricense* 21(1):121-126.
- Chinchilla C. 2010 [Internet]. Las pudriciones de cogollo en palma aceitera: la complejidad del desorden y una guía de convivencia ASD. Costa rica [citado 2012, ago. 18]. Disponible en: <http://www.asd-cr.com/paginas/espanol/articulos/Guia-PC.html>
- Chinchilla C, Escobar R. 2007. El anillo rojo y otras enfermedades de la palma aceitera en Centro y Suramérica. *ASD Palm papers* 30:1-27.
- Clay J.W. 2004. *World Agriculture and the Environment. A commodity-by-Commodity Guide to Impacts and Practice*. Island Press, Washington. USA. p. 203.
- Corley R, Tinker P. 2009. *La palma de aceite*. Cuarta edición. Blackwell Publishing. Oxford, UK. p. 604.
- Corredor A, Martínez G, Silva A. 2008. Problemática de la Pudrición de Cogollo en Tumaco e instrumentos para su manejo y la renovación del cultivo. *Palmas* 29(3):11-16.
- Crous, P.W, Gams W, Stalpers V, Robert V, Stegehuis G. 2004 [Internet]. Mycobank: Fungal database nomenclature and species banks online taxonomic novelties submission. [citado 2012, Sep 15] Disponible en: <http://www.mycobank.com/MycoTaxo.aspx>
- Donald, CE, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press: St. Paul, Minnesota, USA. p. 223.
- Drenth A, Wagels G, Smith B, Sendall B, Dwyer C, Irvine G, Irwin J. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology Society*. 35:147–159
- Duarte S. 2007. Pruebas de patogenicidad in vitro con microorganismos aislados de palmas afectadas por marchitez letal. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. p. 88.
- Duarte, V, De Boer S, Ward L, de Oliveira A. 2004. Characterization of Atypical *Erwinia carotovora* Strains Causing Blackleg of Potato in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 96:535-545.
- Dye DW. 1981. A numerical taxonomic study of the genus *Erwinia*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 24(2):223-229.
- Elliott M. 2009. *Oil Palm Diseases in Ecuador: PC Comparison with Colombia*. Summary Trip Report. p. 16.
- Estévez de Jensen C. 2011. Visita a fincas de palmicultores en San Lorenzo, Provincia de Esmeraldas. Informe de visita. p. 15.

- Fairhurst T., Hårdter R. 2012. Palma de Aceite: Manejo para Rendimientos Altos y Sostenibles. Primera Edición en Español. p. 404.
- Franco Y, Stefanova M, Coronado M. 2004. Patogenicidad y virulencia de aislamientos de *Erwinia* sp. en semillas de papa importada. *Fitosanidad (Cuba)* 8 (4):45-47.
- Franqueville H De. 2001. La Pudrición del Cogollo de la Palma de Aceite en América Latina. Revisión Preliminar de Hechos y Logros Alcanzados. CIRAD, p. 35
- Franqueville, H. De. 2003. Oil palm bud rot in Latin America. Cambridge University Press. United Kingdom. *Expl Agric.* 39: 225-240.
- Gallegly ME, Hong C. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA Fingerprints. APS Press. p. 158.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 84:377–393.
- Horsfall J. 1980. Iatrogenic disease: mechanism of action. Academic Press. New York. p. 343-355.
- Hugh R, Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 66:24-26.
- Kanwischer ME, Mitchell DJ. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. *Phytopathology* 68:1760–1765.
- Laing D. 2009 [internet]. La causa de la pudrición de cogollo (PC) en palma de aceite. [Citado 2012, sep. 19]. Disponible en: http://www.ciat.cgiar.org/Newsroom/Documents/pdf_seminars/2009_06_02_D_Laing.pdf
- Lane, DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons. p. 115-175.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. p. 369.
- López G. 2010. Pudrición del cogollo, Marchitez sorpresiva, Anillo rojo y Marchitez letal en la palma de aceite en América. *Palmas* 12:57-67.
- Mariau D, Van de Lande HL, Renard JL, Dollet M, Rocha de Souza L, Ríos R, Orellana F, Corrado F. 1992. Enfermedades del Tipo Pudrición de Cogollo en Palmas de Aceite en América Latina. Los Síntomas-Epidemiología-Incidencia. *Las semillas Oleaginosas* 47 (11): 605-618.

- Martin F. 1992. *Pythium* appendix a. in: methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. Edit by: L. Singleton, JD Mihail and CM Rush. APS press. p. 255- 256.
- Martinez T, Kocur M. 1964. A taxonomic study of *Erwinia amylovora*. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy. 14: 5-14.
- Morris, BM, Gow NA. 1993. Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathol.* 83: 877–882.
- Múnevar F, Franco P. 2002. Guía general para el muestreo foliar y de suelos en cultivos de palma de aceite. Cenipalma. Bogotá. p. 9-13.
- Nelson, AJ, Elias KS, Arévalo G, Darlington E, Bailey B. 1997. Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* associated with an emerging epidemic in Peru. *Phytopathology* 87:1220-1225
- Perthuis B. de Franqueville H. 1999. Enfermedades que pudren el corazón de la Palma de Aceite. Informe de la misión Shushufindi. Documento CIRAD-CP 1090. p. 19.
- Ploetz, RC. 2003. Diseases of tropical fruit crops. CABI Publishing, Cambridge. p. 307-325.
- Ploetz, RC. 2006. Fusarium-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96:648-652.
- Richardson DL. 1995. The history of oil palm breeding in the United Fruit Company. *ASD Oil Palm Papers* 11:1-22.
- Rivera L. 2007. Identificación y caracterización de hongos y bacterias asociados con la pudrición de cogollo en cocotero (*Cocos nucifera* L.), en la costa norte de Honduras. Tesis. Escuela Panamericana Agrícola Zamorano. p. 17.
- Romero G. 2012. Detección e identificación de patógenos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y de alta fidelidad. Tesis. Universidad de Puerto Rico. p. 163.
- Sarria G, Torres G, Aya H, Ariza J, Rodríguez J, Vélez D, Varón F, Martínez G. 2008. Microorganismos asociados a la pudrición del cogollo de la palma de Aceite y su Inoculación en Palmas de Vivero. *Palmas* 29 (3):19-29.
- Sarria G, Torres G, Aya H, Ariza J, Rodríguez J, Vélez D, Varón Y, Martínez G. 2008. *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del Cogollo de la Palma de Aceite en Colombia. *Palmas* 29 (3):31-40.

- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. APS Press. p. 36-72.
- Silva E. 2008. Estadística y Diseño Experimental. Notas de Clase. Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador. p. 121.
- Singleton L, Mihail J, Rush C. 1992. Methods for Sesearch Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Press. p. 254.
- Swinburne TR. 1993. Fatal yellows bud rot and spear rot of African oil palm. A comparison of the symptoms of these diseases in Brazil, Ecuador and Colombia. *Planter* 69(802): 15-23.
- Torres GA, Sarria GA, Salcedo S, Varon F, Aya H, Ariza J, Morales L, Martinez G. 2003. Prácticas de manejo de la Pudrición de Cogollo (PC) de la Palma de Aceite. *Palmas* 29 (3):63-72.
- Toussoun TA, Nelson PE, Morasas WF. 1983. A Pictorial Guide to the Identification of *Fusarium* species. Second edition. The Pennsylvania State University Press. p. 13-18.
- UNDP. 2010 [Internet]. Palm Oil Scoping Paper: Green Commodities Facility; (Citado 2012, sep. 20). Disponible en: http://www.greencommodities.org/attachments/126_UNDP%20Green%20Commodities%20Facility_Palm%20Oil%20Scoping%20Paper.pdf
- Vanneste, JL. 2000. What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? Pags. 1-6 en: Fire blight. The disease and its causative agent. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Van West P, Morris BM, Reid B, Appiah AA, Osborne MC, Campbell TA, Shepherd SJ, Gow NAR. 2002. Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15(8): 790–798.
- Vega BP. 2009. Etiología de la roya americana de la soya, *Phakopsora meibomia* arthur, en Puerto Rico. Tesis. Universidad de Puerto Rico. p. 119.
- Vidaver, AK, Lambrecht PA. 2004. Bacteria as plant pathogens. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54:474-477.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA p. 315–322.

APÉNDICES

Apéndice 1

Medio papa dextrosa agar acidulado, APDA (Martin, F. 1992a).

Difco potato dextrose agar	39 g
Agua destilada	1 L
Acido láctico	10 ml

Disolver el agar en agua destilada y autoclavar a 125 °C y 15 psi durante 30 minutos. Posteriormente, adicionar el acido láctico, mezclar bien y servir en platos Petri.

Apéndice 2

Medio maíz agar modificado PARP (Kanwischer and Mitchell 1978).

Maíz agar	17 g
Agua destilada	1 L

Combinar los ingredientes y autoclavar. Enfriar el medio hasta 45 °C adicionar los siguientes antibióticos.

Ampicilina	0.27 g
Rifampicina	0.01 g
Piramicina	0.02 g

Procurar adicionar los antibióticos en el siguiente orden: piramicina, rifampicina y ampicilina. Anadir 100 g de pentacloronitrobenceno (PCNB). Mezclar bien y servir.

Apéndice 3

Medio agar nutritivo (AN) (Schaad et al., 2001)

Agar nutritivo	23 g
Agua destilada	1 L

Disolver el agar en agua destilada y autoclavar a 125 °C y 15 psi durante 30 minutos. Enfriar el medio hasta aproximadamente 55 C y servir.

Apéndice 4

Medio extracto de levadura, carbonato de calcio, glucosa (YDC) (Schaad et al., 2001)

Extracto de levadura	10 g
Dextrosa	20 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	10 g
Bacto agar	15 g
Agua destilada	1 L

Añadir los ingredientes en 1 litro de agua destilada y mezclar bien con un agitador. Autoclavar a 125 °C y 15 psi durante 30 minutos. Enfriar el medio hasta aproximadamente 55 °C y servir.

Apéndice 5

Medio agar suave (Schaad et al., 2001)

Glicerol	100 ml
Bacto agar	5 g
Agua destilada	400 ml

Mezclar bien los ingredientes y esterilizar. Servir el medio en tubos de vidrio y esperar que enfrié. Posteriormente, sembrar colonias de la bacteria crecidas durante 48 horas en medio YDC, identificar y sellar con papel parafilm. Realizar dos repeticiones por muestras y conservar a 4 °C.

Apéndice 6

Medio King B (Schaad et al., 2001)

Peptona proteosa #3 Difco	20.0 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	1.5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1.5 g
Glicerol	15.0 ml
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 L

Mezclar todos los ingredientes y autoclavar durante 25 minutos a 120°C.

Apéndice 7

Medio CVP (Schaad et al., 2001)

1 N Hidróxido de potasio (NaOH)	4.5 ml
10% Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	3.0 ml
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	1.0 g
Agar	1.5 g
Polipectado de sodio	10.0 g
SDS	0.5 ml
0.075% cristal violeta	1.0 ml
Agua destilada	500 ml

Precalear 300 ml de agua y agregar el hidróxido de sodio, cloruro de calcio dihidratado, nitrato de sodio, agar y mezclar. Agregar el polipectato de sodio y mezclar. Agregar los 200 ml de agua destilada restantes. Agregar el SDS y el cristal violeta. Autoclavar durante 25 minutos a 120°C.

Apéndice 8

Medio C de Dye (Schaad et al., 2001)

Amonio fosfato monobásico (NH ₄ H ₂ PO ₄)	0.5 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	0.5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Extracto de levadura	1 g
Agar	12 g
Agua destilada	1 L
Púrpura de bromocresol 1.5%	0.7 ml

Mezclar todos los ingredientes y esterilizar 25 minutos a 15 psi y 120°C.

Apéndice 9

Medidas que 20 conidias de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*

No. de conidia	<i>Fusarium solani</i>				<i>Fusarium oxysporum</i>			
	macroconidia		microconidia		microconidia		Macroconidia	
	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	Ancho
	μm				μm			
1	29.31	5.62	10.11	3.31	6.04	2.29	25.81	3.62
2	27.84	5.56	10.07	4.12	4.99	2.56	30.34	3.06
3	27.63	5.53	12.42	4.66	6.09	2.03	35.03	2.97
4	25.43	5.46	10.44	3.81	5.76	2.37	26.10	3.24
5	34.03	5.35	12.61	4.66	4.95	2.78	30.93	3.56
6	32.18	5.12	10.43	4.06	5.41	3.06	53.55	3.06
7	29.83	4.24	13.68	4.52	5.52	2.81	28.33	4.66
8	36.12	5.53	11.44	5.15	4.99	2.47	33.27	3.03
9	33.94	5.15	9.64	4.72	6.60	2.81	26.93	3.09
10	36.03	4.45	10.04	5.58	5.78	2.52	33.72	3.32
11	28.49	6.30	12.16	4.45	4.89	2.21	26.54	2.47
12	31.32	5.18	13.65	4.44	5.64	2.56	30.93	2.16
13	31.23	5.95	13.11	4.43	4.86	2.32	18.45	2.33
14	28.67	5.41	10.44	5.22	4.99	2.37	30.10	3.43
15	28.66	5.81	9.97	3.84	6.95	2.20	32.74	2.79
16	33.39	6.08	11.76	4.72	4.85	2.61	28.88	2.12
17	32.27	5.40	9.99	4.28	4.30	2.92	34.50	3.30
18	27.75	5.44	12.94	5.26	6.20	3.43	37.56	4.02
19	29.65	5.69	10.94	3.85	6.13	2.86	28.95	3.32
20	32.43	5.46	11.39	3.90	5.72	2.97	28.31	3.75
Promedio	30.81	5.44	11.36	4.45	5.53	2.61	31.05	3.17
Desviación Estándar	2.91	0.48	1.34	0.58	0.68	0.35	6.75	0.62

Apéndice 10

Ensayo de formación de ácidos a partir de carbohidratos para aislados de *Erwinia*.

Repeticiones		Aislados																	
		10			11			16			19			C-			C+		
Azúcares	Tiempo (días)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Maltosa	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Apéndice 11

Análisis de las propiedades químicas del suelo en seis palmas muestreadas en la Plantación Aiquisa.

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	--	---

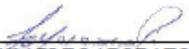
REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	<p style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : AIQUISA Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	<p style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</p> Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	---	---

N° Muest. Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			meq/100ml			ppm				
			NH4	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B
85208	A1	5,17 Ac RC	28,00 M	6,30 B	8,70 B	0,08 B	3,50 B	0,83 B	1,3 B	1,5 M	155,0 A	14,4 M	0,70 M
85209	A2	4,85 Ac RC	47,00 A	7,70 B	8,90 B	0,17 B	3,40 B	0,82 B	2,1 M	2,9 M	287,0 A	23,5 A	0,60 M
85210	A3	4,86 Ac RC	35,00 M	6,30 B	5,70 B	0,10 B	3,90 B	1,00 M	0,6 B	1,7 M	197,0 A	17,9 A	0,60 M
85211	A4	4,63 Ac RC	41,00 A	6,30 B	6,30 B	0,08 B	4,40 M	1,00 M	0,8 B	3,1 M	275,0 A	11,9 M	0,50 M
85212	A5	4,72 Ac RC	38,00 M	7,90 B	20,00 M	0,09 B	3,40 B	1,20 M	1,0 B	1,9 M	157,0 A	11,8 M	0,60 M
85213	A6	5,40 Ac RC	43,00 A	8,60 B	13,00 M	0,22 M	6,70 M	0,90 B	1,1 B	1,7 M	204,0 A	11,4 M	0,60 M

INTERPRETACION		
pH		Elementos
Ac = Acido	N = Neutro	B = Bajo
LAc = Liger. Acido	LAl = Lige. Alcalino	M = Medio
PN = Prac. Neutro	Al = Alcalino	A = Alto
RC = Requieren Cal		T = Tóxico (Boro)

METODOLOGIA USADA	
pH = Suelo: agua (1:2,5)	P K Ca Mg = Olsen Modificado
S, B = Fosfato de Calcio	Cu Fe Mn Zn = Olsen Modificado
	B = Curcumina


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 11

Análisis de las propiedades químicas del suelo en seis palmas muestreadas en la Plantación Aiquisa (Continuación).

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	--	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

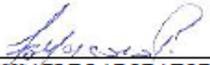
DATOS DEL PROPIETARIO	DATOS DE LA PROPIEDAD	PARA USO DEL LABORATORIO
Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	Nombre : AIQUISA Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 37 1/2 VIA STO. DOMINGO	Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011

N° Muestr.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural
	Al+H	Al	Na			Mg	K	K				Σ Bases	Arena	Limo	
85208	0,70 M				2,30 B	4,22	10,38	54,13	5,11		53,30				
85209	1,70 T	0,60 M			4,20 M	4,15	4,82	24,82	6,09		142,00				
85210	2,70 T	0,70 M			2,60 B	3,90	10,00	49,00	7,70		79,90				
85211	5,00 T	2,30 T			3,30 M	4,40	12,50	67,50	10,48		181,10				
85212	1,80 T	0,60 M			2,50 B	2,83	13,33	51,11	6,49		138,50				
85213	0,50 M				3,30 M	7,44	4,09	34,55	8,32		177,50				

INTERPRETACION			
Al+H, Al y Na	C.E.		M.O. y Cl
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino	M = Medio
T = Tóxico			A = Alto

ABREVIATURAS
C.E. = Conductividad Eléctrica
M.O. = Materia Orgánica
RAS = Relación de Adsorción de Sodio

METODOLOGIA USADA
C.E. = Pasta Saturada
M.O. = Dicromato de Potasio
Al+H = Titulación NaOH


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 12

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Kayalú.

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	---	---

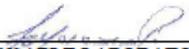
REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	<p style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : KAYALU Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	<p style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</p> Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	--	---

N° Muest Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			meq/100ml			ppm				
			NH ₄	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B
85223	K1	4,45 Ac RC	65,00 A	9,30 B	6,50 B	0,21 M	0,92 B	0,28 B	1,7 B	2,1 M	305,0 A	10,5 M	0,70 M
85224	K2	4,82 Ac RC	22,00 M	7,00 B	9,70 B	0,32 M	2,70 B	0,95 B	2,1 M	3,0 M	167,0 A	6,3 M	0,70 M
85225	K3	4,62 Ac RC	32,00 M	7,40 B	14,00 M	0,19 B	3,40 B	1,20 M	2,6 M	6,6 A	192,0 A	16,8 A	0,60 M
85226	K4	5,10 Ac RC	24,00 M	3,50 B	11,00 M	0,13 B	4,30 M	1,20 M	1,3 B	3,2 M	155,0 A	23,6 A	0,60 M

INTERPRETACION		
pH		Elementos
Ac = Acido	N = Neutro	B = Bajo
LAc = Liger. Acido	LAl = Lige. Alcalino	M = Medio
PN = Prac. Neutro	Al = Alcalino	A = Alto
RC = Requieren Cal		T = Tóxico (Boro)

METODOLOGIA USADA	
pH = Suelo: agua (1:2,5)	P K Ca Mg = Olsen Modificado
S, B = Fosfato de Calcio	Cu Fe Mn Zn = Olsen Modificado
	B = Curcumina


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 12

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Kayalú (Continuación).

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	---	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO	DATOS DE LA PROPIEDAD	PARA USO DEL LABORATORIO
Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	Nombre : KAYALU Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011

N° Muest.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural
	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla	
85223	3,20 T	0,90 M			4,40 M	3,29	1,33	5,71	4,61		168,60				
85224	1,80 T	0,50 M			2,40 B	2,84	2,97	11,41	5,77		88,80				
85225	3,80 T	1,30 T			3,00 M	2,83	6,32	24,21	8,59		74,60				
85226	1,10 M	0,50 M			2,80 B	3,58	9,23	42,31	6,73		94,10				

INTERPRETACION			
Al+H, Al y Na	C.E.		M.O. y Cl
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino	M = Medio
T = Tóxico			A = Alto

ABREVIATURAS
C.E. = Conductividad Eléctrica
M.O. = Materia Orgánica
RAS = Relación de Adsorción de Sodio

METODOLOGIA USADA
C.E. = Pasta Saturada
M.O. = Dicromato de Potasio
Al+H = Titulación NaOH


 RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


 LABORATORISTA

Apéndice 13

Análisis de las propiedades químicas del suelo en ocho palmas muestreadas en la Plantación Palmeras de los Andes.

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPESCUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
---	---	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	<p style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : P D A Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	<p style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</p> Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	---	---

N° Muest Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			meq/100ml			ppm				
			NH ₄	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B
85192	PDA 1	4,50 Ac RC	240,00 A	14,00 M	121,00 A	1,20 A	3,40 B	1,10 M	3,2 M	4,9 A	215,0 A	153,8 A	5,80 T
85193	PDA 2	5,26 Ac RC	720,00 A	65,00 A	68,00 A	1,80 A	1,60 B	0,82 B	3,1 M	5,0 A	175,0 A	99,8 A	3,90 T
85194	PDA 3	6,18LAc	99,00 A	62,00 A	24,00 A	2,20 A	5,90 M	2,80 A	6,0 M	7,1 A	289,0 A	68,4 A	0,90 M
85195	PDA 4	5,73LAc	25,00 M	18,00 M	20,00 M	1,10 A	3,20 B	2,10 A	1,9 B	3,0 M	112,0 A	28,4 A	0,70 M
85196	PDA 7	4,63 Ac RC	41,00 A	7,90 B	12,00 M	0,59 A	1,50 B	0,47 B	1,5 B	2,5 M	228,0 A	28,8 A	0,70 M
85197	PDA 8	5,27 Ac RC	30,00 M	5,10 B	7,90 B	0,31 M	4,60 M	1,70 M	3,3 M	2,7 M	107,0 A	34,9 A	0,70 M
85198	PDA 9	4,46 Ac RC	63,00 A	18,00 M	10,00 M	0,27 M	1,60 B	1,00 M	1,7 B	2,1 M	271,0 A	34,5 A	0,60 M
85199	PDA 10	5,68LAc	27,00 M	4,20 B	2,20 B	0,32 M	3,70 B	0,93 B	1,7 B	1,9 M	99,0 A	57,3 A	0,80 M

INTERPRETACION			
pH		Elementos	
Ac	= Acido	N	= Neutro
LAc	= Liger. Acido	LAl	= Lige. Alcalino
PN	= Prac. Neutro	Al	= Alcalino
		RC	= Requieren Cal
		B	= Bajo
		M	= Medio
		A	= Alto
		T	= Tóxico (Boro)

METODOLOGIA USADA			
pH	= Suelo: agua (1:2,5)	P K Ca Mg	= Olsen Modificado
S, B	= Fosfato de Calcio	Cu Fe Mn Zn	= Olsen Modificado
		B	= Curcumina


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 13

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Kayalú (Continuación).

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	---	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO	DATOS DE LA PROPIEDAD	PARA USO DEL LABORATORIO
Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	Nombre : P D A Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011

N° Muestr. Laborat.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural
	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla	
85192	1,40 M	0,50 M			3,20 M	3,09	0,92	3,75	7,10		257,40				
85193	1,70 T	1,10 T			2,40 B	1,95	0,46	1,34	5,92		417,10				
85194					5,30 A	2,11	1,27	3,95	10,90		310,60				
85195					2,20 B	1,52	1,91	4,82	6,40		159,80				
85196	2,40 T	1,00 M			3,00 M	3,19	0,80	3,34	4,96		145,60				
85197	0,60 M				2,00 B	2,71	5,48	20,32	7,21		94,10				
85198	2,00 T	0,60 M			4,70 M	1,60	3,70	9,63	4,87		142,00				
85199					2,00 B	3,98	2,91	14,47	4,95		106,50				

INTERPRETACION			
Al+H, Al y Na	C.E.		M.O. y Cl
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino	M = Medio
T = Tosco			A = Alto

ABREVIATURAS
C.E. = Conductividad Eléctrica
M.O. = Materia Orgánica
RAS = Relación de Adsorción de Sodio

METODOLOGIA USADA
C.E. = Pasta Saturada
M.O. = Dicromato de Potasio
Al+H = Titulación NaOH


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 14

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Alespalma.

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	---	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	<p style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : ALESPALMA Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	<p style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</p> Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	---	---

N° Muest Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			meq/100ml			ppm				
			NH4	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B
85214	AL1	4,87 Ac RC	44,00 A	12,00 M	13,00 M	0,09 B	2,40 B	0,50 B	1,2 B	1,5 M	184,0 A	66,3 A	1,50 T
85215	AL2	5,44 Ac RC	30,00 M	7,70 B	16,00 M	0,27 M	4,60 M	0,77 B	1,2 B	2,4 M	114,0 A	64,2 A	0,80 M
85216	AL3	4,32 Ac RC	27,00 M	13,00 M	26,00 A	0,25 M	1,10 B	0,37 B	0,8 B	3,4 M	168,0 A	8,3 M	0,80 M
85217	AL4	4,34 Ac RC	32,00 M	62,00 A	28,00 A	0,34 M	2,20 B	0,64 B	0,8 B	2,7 M	191,0 A	19,8 A	1,30 T

INTERPRETACION		
pH		Elementos
Ac = Acido	N = Neutro	B = Bajo
LAc = Liger. Acido	LAl = Lige. Alcalino	M = Medio
PN = Prac. Neutro	Al = Alcalino	A = Alto
RC = Requieren Cal		T = Tóxico (Boro)

METODOLOGIA USADA	
pH = Suelo: agua (1:2,5)	P K Ca Mg = Olsen Modificado
S, B = Fosfato de Calcio	Cu Fe Mn Zn = Olsen Modificado
	B = Curcumina


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 14

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Alespalma (Continuación).

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	--	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	<p style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : ALESPALMA Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	<p style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</p> Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	---	---

N° Muest. Laborat.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural
	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla	
85214	1,20 M	0,50 M			2,40 B	4,80	5,56	32,22	4,19		115,40				
85215	0,40 B				2,20 B	5,97	2,85	19,89	6,04		106,50				
85216	4,50 T	2,00 T			1,70 B	2,97	1,48	5,88	6,22		106,50				
85217	3,40 T	1,30 T			2,10 B	3,44	1,88	8,35	6,58		160,90				

INTERPRETACION			
Al+H, Al y Na	C.E.		M.O. y Cl
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino	M = Medio
T = Tóxico			A = Alto

ABREVIATURAS
C.E. = Conductividad Eléctrica
M.O. = Materia Orgánica
RAS = Relación de Adsorción de Sodio

METODOLOGIA USADA
C.E. = Pasta Saturada
M.O. = Dicromato de Potasio
Al+H = Titulación NaOH


RESPONSABLE LABORATORIO


LABORATORISTA

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina

Apéndice 15

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cinco palmas muestreadas en la Plantación Palesema

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	---	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	<p style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : PALESEMA Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	<p style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</p> Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	--	---

N° Muest. Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			meq/100ml			ppm				
			NH ₄	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B
85218	P1	5,24 Ac RC	33,00 M	11,00 M	8,20 B	0,31 M	4,40 M	1,30 M	2,9 M	2,4 M	186,0 A	48,7 A	0,80 M
85219	P2	4,71 Ac RC	30,00 M	21,00 A	12,00 M	0,65 A	3,30 B	1,10 M	1,7 B	2,6 M	194,0 A	40,3 A	1,10 T
85220	P3	5,10 Ac RC	36,00 M	5,10 B	8,20 B	0,54 A	3,20 B	0,85 B	1,7 B	2,0 M	173,0 A	57,4 A	0,80 M
85221	P4	4,58 Ac RC	40,00 M	8,40 B	10,00 M	0,28 M	1,80 B	0,50 B	1,2 B	2,0 M	242,0 A	58,1 A	0,80 M
85222	P5	4,63 Ac RC	42,00 A	5,10 B	9,70 B	0,11 B	2,50 B	0,47 B	1,3 B	2,0 M	247,0 A	27,7 A	0,70 M

INTERPRETACION			
pH		Elementos	
Ac	= Acido	N	= Neutro
LAc	= Liger. Acido	LAI	= Lige. Alcalino
PN	= Prac. Neutro	Al	= Alcalino
		RC	= Requieren Cal
		B	= Bajo
		M	= Medio
		A	= Alto
		T	= Tóxico (Boro)

METODOLOGIA USADA			
pH	= Suelo: agua (1:2,5)	P K Ca Mg	= Olsen Modificado
S, B	= Fosfato de Calcio	Cu Fe Mn Zn	= Olsen Modificado
		B	= Curcumina


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 15

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cinco palmas muestreadas en la Plantación Palesema (Continuación).

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	--	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	DATOS DE LA PROPIEDAD Nombre : PALESEMA Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	PARA USO DEL LABORATORIO Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	--	---

N° Muest. Laborat.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural
	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla	
85218	0,50 M				2,60 B	3,38	4,19	18,39	6,51		97,60				
85219	1,50 M	0,50 M			2,30 B	3,00	1,69	6,77	6,55		168,60				
85220	1,10 M	0,40 M			2,40 B	3,76	1,57	7,50	5,69		97,60				
85221	1,70 T	0,60 M			3,20 M	3,60	1,79	8,21	4,28		150,90				
85222	2,50 T	0,90 M			2,90 B	5,32	4,27	27,00	5,58		97,60				

INTERPRETACION			
Al+H, Al y Na	C.E.		M.O. y Cl
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino	M = Medio
T = Tóxico			A = Alto

ABREVIATURAS
C.E. = Conductividad Eléctrica
M.O. = Materia Orgánica
RAS = Relación de Adsorción de Sodio

METODOLOGIA USADA
C.E. = Pasta Saturada
M.O. = Dicromato de Potasio
Al+H = Titulación NaOH


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 16

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Palpailón.

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	--	---

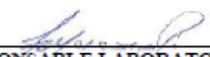
REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	<p style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : PALPAILON Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	<p style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</p> Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	---	---

N° Muest Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			meq/100ml			ppm				
			NH ₄	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B
85200	PAL 1	4,51 Ac RC	36,00 M	30,00 A	15,00 M	0,24 M	1,60 B	0,40 B	2,0 M	2,1 M	176,0 A	36,7 A	3,40 T
85201	PAL 2	4,71 Ac RC	30,00 M	24,00 A	15,00 M	0,34 M	2,20 B	0,56 B	1,6 B	2,1 M	154,0 A	39,7 A	3,20 T
85202	PAL 3	4,20 Ac RC	32,00 M	74,00 A	26,00 A	0,69 A	1,30 B	0,40 B	1,1 B	1,4 M	227,0 A	17,4 A	1,10 T
85203	PAL 4	4,51 Ac RC	60,00 A	53,00 A	12,00 M	1,10 A	3,20 B	0,76 B	2,1 M	3,8 M	249,0 A	58,3 A	1,70 T

INTERPRETACION		
pH		Elementos
Ac = Acido	N = Neutro	B = Bajo
LAc = Liger. Acido	LAl = Lige. Alcalino	M = Medio
PN = Prac. Neutro	Al = Alcalino	A = Alto
RC = Requieren Cal		T = Tóxico (Boro)

METODOLOGIA USADA		
pH = Suelo: agua (1:2,5)	P K Ca Mg = Olsen Modificado	
S, B = Fosfato de Calcio	Cu Fe Mn Zn = Olsen Modificado	
	B = Curcumina	


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 16

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Palpailón (Continuación).

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	---	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	DATOS DE LA PROPIEDAD Nombre : PALPAILON Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	PARA USO DEL LABORATORIO Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	---	---

N° Muest. Laborat.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural
	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla	
85200	1,80 T	0,40 M			1,80 B	4,00	1,67	8,33	4,04		106,50				
85201	1,20 M	0,50 M			1,80 B	3,93	1,65	8,12	4,30		168,60				
85202	2,60 T	0,50 M			2,20 B	3,25	0,58	2,46	4,99		213,00				
85203	1,10 M	0,50 M			3,30 M	4,21	0,69	3,60	6,16		248,50				

INTERPRETACION					
Al-H, Al y Na		C.E.		M.O. y Cl	
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo	M = Medio	A = Alto
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino			
T = Tóxico					

ABREVIATURAS
C.E. = Conductividad Eléctrica
M.O. = Materia Orgánica
RAS = Relación de Adsorción de Sodio

METODOLOGIA USADA
C.E. = Pasta Saturada
M.O. = Dicromato de Potasio
Al+H = Titulación NaOH


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 17

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Tabuche.

 INIAP <small>INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</small>	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693	
--	---	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	<p style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : TABUCHE Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	<p style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</p> Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011
--	---	---

N° Muest. Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			meq/100ml			ppm				
			NH ₄	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B
85204	T1	6,31LAc	23,00 M	43,00 A	4,20 B	1,30 A	17,10 A	2,40 A	2,2 M	3,6 M	95,0 A	12,1 M	0,90 M
85205	T2	5,98LAc	21,00 M	25,00 A	4,00 B	0,71 A	16,40 A	2,30 A	1,5 B	4,4 A	137,0 A	11,2 M	0,80 M
85206	T3	5,78LAc	28,00 M	38,00 A	6,10 B	0,92 A	17,00 A	2,30 A	2,8 M	4,2 A	133,0 A	17,4 A	0,80 M
85207	T4	6,43LAc	24,00 M	39,00 A	2,60 B	1,10 A	17,30 A	2,20 A	1,7 B	3,5 M	68,0 A	16,5 A	0,80 M

INTERPRETACION		
pH		Elementos
Ac	= Acido	N = Neutro
LAc	= Liger. Acido	LAl = Lige. Alcalino
PN	= Prac. Neutro	Al = Alcalino
RC	= Requieren Cal	T = Tóxico (Boro)

METODOLOGIA USADA		
pH	= Suelo: agua (1:2,5)	P K Ca Mg = Olsen Modificado
S, B	= Fosfato de Calcio	Cu Fe Mn Zn = Olsen Modificado
		B = Curcumina


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA

Apéndice 17

Análisis de las propiedades químicas del suelo en cuatro palmas muestreadas en la Plantación Tabuche (Continuación).

 <p>INIAP INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS</p>	<p>ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693</p>	
--	--	---

REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO	DATOS DE LA PROPIEDAD	PARA USO DEL LABORATORIO
Nombre : ANCUPA Dirección : QUININDE Ciudad : Teléfono : Fax :	Nombre : TABUCHE Provincia : ESMERALDAS Cantón : QUININDE Parroquia : Ubicación : KM 371/2 VIA STO. DOMINGO	Cultivo Actual : PALMA AFRICANA Fecha de Muestreo : 06/07/2011 Fecha de Ingreso : 22/07/2011 Fecha de Salida : 10/08/2011

N° Muest. Laborat.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural
	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla	
85204					2,50 B	7,13	1,85	15,00	20,80		88,80				
85205					2,10 B	7,13	3,24	26,34	19,41		115,40				
85206					3,30 M	7,39	2,50	20,98	20,22		97,60				
85207					3,00 M	7,86	2,00	17,73	20,60		97,60				

INTERPRETACION					
Al+H, Al y Na		C.E.		M.O. y Cl	
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo	M = Medio	A = Alto
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino			
T = Tóxico					

ABREVIATURAS	
C.E.	= Conductividad Eléctrica
M.O.	= Materia Orgánica
RAS	= Relación de Adsorción de Sodio

METODOLOGIA USADA	
C.E.	= Pasta Saturada
M.O.	= Dicromato de Potasio
Al+H	= Titulación NaOH


RESPONSABLE LABORATORIO

Para la versión original, favor remitirse al Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de INIAP Sta. Catalina


LABORATORISTA