

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Identificación de *Phytophthora palmivora*
como el agente causal de la pudrición del cogollo
en palmito (*Bactris gasipaes*) en el Ecuador**

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas

DARÍO ANDRÉS JÁCOME ROMERO

Quito, 2016

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Darío Andrés Jácome Romero ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

María Eugenia Ordoñez, Ph.D

Directora de la Disertación

Quito, 9 de mayo de 2016

AGRADECIMIENTOS

A la doctora María Eugenia Ordoñez por su colaboración, dedicación, tiempo y energía empleados en el proyecto.

A mi familia por su colaboración, comprensión y cariño.

A mis grandes amigos Nelson Dueñas, Cristina Toapanta por su colaboración, tiempo, apoyo y amistad.

A la Estación Científica Yasuní por su apoyo conjunto a todo el personal de la estación por su colaboración en el proyecto.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por financiar la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 PHYLLUM OOMYCOTA	3
3.2 <i>Phytophthora</i>	4
3.3 <i>Phytophthora palmivora</i>	5
3.4 <i>Bactris gasipaes</i> Y LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO	6
3.5 POSTULADO DE KOCH	8
3.6 OBJETIVOS	10
3.6.1 OBJETIVO GENERAL	10
3.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1 SIEMBRA DE SEMILLA	11
4.2 INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS	12
4.3 AISLAMIENTO DE <i>P. palmivora</i>	14
4.4 IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO.....	15
5. RESULTADOS	17
5.1 SEMILLAS DE <i>Bactris gasipaes</i>	17
5.2 RESULTADOS DE LAS INOCULACIONES	17
5.3 IDENTIFICACIÓN DE <i>Phytophthora palmivora</i>	18
5.3.1 KIT DE IDENTIFICACIÓN PARA <i>Phytophthora</i> AGDIA IMMUNOSTRIP.....	18
6. DISCUSIÓN.....	20
7. LITERATURA CITADA.....	26
8. FIGURAS	31
9. TABLAS.....	44
10. ANEXOS.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representación del ciclo de vida de <i>Phytophthora</i>	31
Figura 2.	Esquema filogenético de la relación entre Peronosporales comparada con la roya blanca (tomado de Thines, 2013)	32
Figura 3.	Análisis de máxima parsimonia de los genes concatenados <i>cox2</i> , <i>nad9</i> , <i>rps10</i> , y <i>secY</i> a partir de las especies de <i>Phytophthora</i> , <i>Phytophthora vexans</i> y <i>P. undulatum</i> como grupos externos.....	33
Figura 4.	Obtención de suspensión de zoósporas de <i>Phytophthora palmivora</i> para la inoculación de plántulas de <i>Bactris gasipaes</i>	34
Figura 5.	Tratamientos de inoculación en el suelo	355
Figura 6.	Tratamientos de inoculación del cogollo	355
Figura 7.	Tratamientos de inoculación de hoja	366
Figura 8.	Aislamiento de <i>P. palmivora</i> en papaya	377
Figura 9.	Síntomas de PC en plántulas de <i>B. gasipaes</i> inoculadas con <i>P. palmivora</i>	38
Figura 10.	Síntomas de PC en plántulas de <i>B. gasipaes</i> inoculadas con <i>P. palmivora</i>	39
Figura 11.	Resultados de la prueba de identificación para <i>Phytophthora</i>	40
Figura 12.	Electroforesis de los productos de amplificación	41
Figura 13.	Medidas de esporangios de <i>P. palmivora</i>	41
Figura 14.	Medidas de pedicelos de esporangios de <i>P. palmivora</i>	42
Figura 15.	Medidas de largo de zoósporas de <i>P. palmivora</i>	42
Figura 16.	Crecimiento de <i>P. palmivora</i> en medio de cultivo V8.....	43
Figura 17.	Cultivos puros de <i>P. palmivora</i>	43

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Métodos de inoculación.....	444
Tabla 2.	Resultado de plantas con síntomas de pudrición de cogollo, aislamiento y re-aislamiento en cultivo puro.	45

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1.	Receta de medio V8 Piramicina, Ampicilina, Rifamicina, Pentacloronitrobenzeno e Hymexazol (PARPH)	46
Anexo 2.	Datos de temperatura máxima y mínima por día registrados por datalogger	47
Anexo 3.	Comparación de las secuencias obtenidas en el re-aislamiento con Blastn.....	48
Anexo 4.	Medidas del largo y ancho de 20 esporangios escogidos al azar.....	48
Anexo 5.	Nota científica publicada	49

1. RESUMEN

La pudrición de cogollo o PC ha sido la enfermedad responsable de grandes pérdidas económicas para el sector palmicultor en el Ecuador. *Phytophthora palmivora*, el agente causal de la pudrición del cogollo, ataca a varios hospederos como la palma africana (*Elaeis guineensis*), cacao (*Theobroma cacao*), café (*Coffea arabica*), entre otros. En la presente investigación se identificó a *P. palmivora* como el agente causal de la pudrición de cogollo en el palmito *Bactris gasipaes* var. *gasipaes* Kunth por medio de los postulados de Koch. Se realizaron 7 tratamientos de los cuales en 5 se lograron re-aislar a *Phytophthora palmivora*. El tratamiento con mayor número de plantas con síntomas de pudrición de cogollo fue el tratamiento 2.1 inyección en el cogollo con 20/25 plántulas con PC. El número de plantas infectadas en este tratamiento sugiere que la planta debe recibir una herida directa al cogollo para que la enfermedad pueda desarrollarse, además se sugiere que dicha herida podría ser causada por un insecto o por un daño mecánico al cogollo. Los resultados también sugieren que el proceso infeccioso puede iniciar en la hoja por medio de las zoósporas que penetran por los espacios intercelulares de la hoja y por las estomas. Los postulados de Koch fueron completados exitosamente, los mismos que permitieron identificar a *Phytophthora palmivora* como el agente causal de la pudrición del cogollo en el palmito (*Bactris gasipaes*) en el Ecuador. Investigaciones anteriores han intentado aislar el patógeno fallidamente, por lo cual la metodología de esta investigación pretende ser una estandarización para el aislamiento de *Phytophthora palmivora* gracias a su efectividad. La efectividad del método de aislamiento empleado en esta investigación es importante debido a que permite la identificación del agente causal principal de la pudrición de cogollo y no a los agentes causales secundarios. Se sugiere que la correcta identificación del agente causal permite el manejo de la enfermedad de una manera mucho más efectiva, permitiendo combatir al patógeno.

Palabras clave: Agente causal, *Bactris gasipaes*, Ecuador, PC, *Phytophthora palmivora*, postulados de Koch, pudrición de cogollo.

2. ABSTRACT

The bud rot is the disease responsible of large economic losses for the palm sector in Ecuador. *Phytophthora palmivora* the causal agent of the bud rot, attacks several hosts like the oil palm (*Elaeis guineensis*), cacao (*Theobroma cacao*) coffee (*Coffea arabica*) among others. In this investigation *P.palmivora* was identified as the causal agent of bud rot in palm heart *Bactris gasipes* var. *gasipaes* Kunth using the Koch's postulates. Seven treatments were performed of which 5 *Phytophthora palmivora* was re-isolated. The treatment with more plants with bud rot symptoms was the treatment 2.1 injection in the bud with 20/25 plants. The number of infected plants in 2.1 treatment suggests that the plant should receive a direct injury to the heart so that the disease develops, also suggests that the injury could be caused by an insect or mechanical damage to the heart of the palm. The results also suggest that the infectious process initiates on the leave through the zoospores that penetrate intercellular spaces and stomata. The Koch's postulates were completed successfully, which allowed the identification of *Phytophthora palmivora* as the causal agent of bud rot in the heart palm (*Bactris gasipaes*) in Ecuador. In previous research it has unsuccessfully attempted to isolate the pathogen, so the methodology of this research aims to be a standardization for the isolation of *Phytophthora palmivora* due to its effectiveness. The effectiveness of the isolation method used in this research is important because it allows the identification of the main causal agent of bud rot rather than secondary causal agents. It is suggested that the correct identification of the causal agent enables the disease management in an effective way, allowing to combat the pathogen.

Key words: *Bactris gasipaes*, bud rot, causal agent, Ecuador, Koch's postulates, *Phytophthora palmivora*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 PHYLLUM OOMYCOTA

El phylum Oomycota, al que pertenece *Phytophthora palmivora*, ha sido clasificado dentro de varios reinos, empezando por el reino Fungi, posteriormente ubicado en los Chromistas, y finalmente en el reino Stramenopila (Ribeiro, 2013). Debido a la presencia de hifas filamentosas es que originalmente se los clasificó dentro del reino de los hongos, sin embargo, este grupo se encuentra más cercanamente relacionado a las algas cafés que a los verdaderos hongos (Schuman y D'Arcy, 2010; Fry y Niklaus, 2010). La clase Oomycetes presenta un orden: Peronosporales. Dentro de este orden *Phytophthora* se encuentra en la familia Peronosporaceae junto con los mohos acuáticos o “water molds”.

La característica principal que separan a los Oomycota de los hongos verdaderos es la presencia de una pared celular conformada de β -1,3, y β -1,6 glucanos, a diferencia de la pared celular de los hongos está compuesta de quitina, el cual es un polímero de N-acetyl glucosa amina (Fry y Niklaus, 2010). En Oomycota las hifas no se encuentran septadas lo que resulta en una condición multinucleada de las hifas conocida como cenocítica (Schuman y D'Arcy, 2010). Además, en Oomycota los núcleos son diploides (2N) en la fase vegetativa, condición predominante en su ciclo de vida (Schuman y D'Arcy, 2010). Varias especies de Oomycota producen zoósporas sin pared celular, las mismas que son acuáticas, biflageladas y están contenidas en estructuras llamadas esporangios (Fry y Niklaus, 2010).

3.2 *Phytophthora*

Hace un poco más de 150 años la primera especie de *Phytophthora*, *P. infestans*, fue descrita por Anton de Bary (Ribeiro, 2013). A partir de ese entonces la investigación alrededor de este género ha continuado con el estudio de su taxonomía, biología, fisiología, patología y ecología. El enorme esfuerzo y énfasis que se ha empleado en el género ha sido debido a las grandes pérdidas agrícolas, económicas, humanas que mundialmente *Phytophthora* ha causado (Ribeiro, 2013). El género comprende en su ciclo de vida varias estructuras que les permite desplazarse, resistir a condiciones no favorables, así como reproducirse o vivir la mayoría del tiempo en un estado diploide vegetativo (Figura 1).

El género *Phytophthora* es el segundo más grande dentro de la familia Peronosporaceae, que en la actualidad comprende 123 especies formalmente descritas (Ribeiro, 2013). Las especies del género *Phytophthora* han sido distribuidas en diez clados filogenéticos en base al análisis de secuencias de ITS (Espaciador Interno Transcrito) concatenadas y secuencias de la subunidad grande del ribosoma (Figura 2) (Thines, 2013). Los clados basales (numerados del ocho al diez en la Figura 2) se caracterizan por ser especies del suelo, con un número mayor de hospederos que los clados superiores (clados 1, 2, 4) que incluyen especies aéreas. Los clados intermedios contienen especies con características intermedias. Por ejemplo los clados 3 y 5 son mayormente aéreos, mientras los clados 6 y 7 son del suelo (Thines, 2013).

3.3 *Phytophthora palmivora*

Phytophthora palmivora es conocido como un patógeno cosmopolita con un amplio rango de hospederos, que incluyen al cacao, papaya, pimienta negra, caucho, coco y cítricos (McHaw y Coffey, 1994). El género *Phytophthora* incluyendo a la especie *palmivora* es hemibiótrofo, lo que significa que en el inicio del proceso infeccioso se alimenta de la células vivas del hospedero y continúan alimentándose del hospedero después de muerto (Thines, 2013).

Se ha sugerido que el origen de *P. palmivora* es el sudeste Asiático. En 1907 fue descrita por E. J. Butler como *P. faberi*, aislada de palmas y de cocos. En 1918 fue reclasificada como *P. palmivora* (Stamps *et al.*, 1990). Su nombre proviene del hospedero del que fue aislado, conocido como palma Palmyra, *Borassus flabellifer*, que fue una de las tres especies de árboles de las cuales el patógeno fue originalmente aislado (Stamps *et al.*, 1990).

Una de las principales enfermedades causadas por *P. palmivora* ha sido la enfermedad de la vaina negra de cacao “black pod”, que ha sido reportada en todo el mundo (Ashby, 1929; Brooks, 2005). En el oeste y centro de África *P. palmivora* ocurre en la misma área que *P. megakarya*. Ambas especies son capaces de causar la enfermedad de la vaina negra. *Phytophthora palmivora* también es el causante de cancro, pudrición de la fruta, y pudrición de la raíz de cítricos; pudrición de cogollo y del fruto en el coco; pudrición del tallo y la raíz en la papaya; pudrición de la raíz y pudrición del cuello en la pimienta negra; cancro, pudrición de la raíz, tizón de la hoja, y la pudrición de la fruta en el

durían (Brooks, 2005). Se ha determinado que el inóculo es dispersado por la salpicadura de las gotas de agua, el viento, insectos y actividades humanas (Brooks, 2005).

Tras la propuesta de varias hipótesis erróneas, en 2008 se sugirió que una especie de *Phytophthora* era la causante de la pudrición de cogollo (PC) en palma africana (Drenth *et al.*, 2013). Así, en 2013 se determinó que el agente causal de la PC en la palma de aceite era *P. palmivora*, y estaba presente en Sudamérica y Centro América incluyendo países como Colombia, Brasil, Costa Rica, Ecuador, Nicaragua, Panamá, Perú e inclusive Surinam (Drenth *et al.*, 2013).

La morfología de *P. palmivora* se describe como un organismo heterotálico, con anteridios anfígenos y oogonios esféricos; presenta esporangios caducos y papilados, los cuales varían en forma de ovoide- elipsoide a obpiriforme; presenta clamidosporas terminales e intercalares con un promedio de 33 μm de diámetro (Erwin y Ribeiro, 1996).

La clasificación taxonómica de *P. palmivora*, en base a análisis de cuatro loci nucleares, ubican a la especie en el clado filogenético 4, junto con *P. megakarya* y *P. quercetorum* (Blair *et al.*, 2008) (Figura 3). Según Runge *et al.* (2011) *P. palmivora* se encuentra en el clado 4.2 relacionada con especies biótropas de mohos acuáticos.

3.4 *Bactris gasipaes* Y LA PUDRICIÓN DEL COGOLLO

El palmito, *Bactris gasipaes* var. *gasipaes* Kunth, también conocido como chontaduro, pertenece a la familia Arecaceae, y es la única palma domesticada por sus frutos desde la época precolombina en el neotrópico (Montúfar y Rosas, 2013). La

distribución geográfica de esta especie es amplia, extendiéndose desde el centro de Bolivia hasta el noroccidente de Honduras y desde la desembocadura del río Amazonas hasta la costa de Ecuador y Colombia. *Bactris gasipaes* es una palma de sotobosque muy poblada de espinos negros en los entrenudos que pueden alcanzar de 5-15 cm de largo, así como también existen variedades cultivadas que no presentan espinos. El tallo es solitario o cespitoso, presenta hojas compuestas de 2-5 m de largo, con 90-145 pares de folíolos. Tiene un crecimiento anual entre 1.5 a 2 metros alcanzada la adultez (de tres a cinco años a partir de ser plantada), y puede producir una infrutescencia capaz de pesar hasta 19kg (Montúfar y Rosas, 2013). Esta palma se cultiva para la producción de frutos y palmitos, pero además su madera se usa para artesanías y muebles (Montúfar y Rosas, 2013). En los últimos 10 años la producción de palmitos en el Ecuador se ha duplicado de 14760 toneladas en el 2000 hasta 30914 toneladas en el 2012, posicionando al país como el primer exportador en el mundo (Montúfar y Rosas, 2013). Las plantas comerciales de palmito provienen de semillas de varias fuentes de palmas domesticadas de la Amazonía, lo que hace a la población de palmito comercial heterogénea.

Una de las enfermedades que afecta al palmito es la llamada pudrición del cogollo o PC. Existen registros de que los patógenos más comunes que causan pudrición de cogollo en palmas son *P. palmivora* y *Thielaviopsis paradoxa* (Garófalo y McMillan, 2004; Uchida, 2004). Estos patógenos al infectar una palma, colonizan su único meristemo apical, conocido también como corazón de la palma. Una vez atacado el meristemo apical, la palma comienza a perder la capacidad de producir hojas jóvenes y eventualmente muere (Uchida, 2004). El primer síntoma de la pudrición de cogollo (PC) que se observa en la palma es la decoloración y el marchitamiento de la flecha, la siguiente hoja más joven también sufre decoloración y marchitamiento. Una vez que la infección ha alcanzado un

grado importante la flecha se desprende del meristemo apical y todas las hojas se vuelven cloróticas. Estas hojas casualmente se disecan, tornándose cafés y finalmente colapsan (Elliot, 2005).

3.5 POSTULADOS DE KOCH

Las enfermedades en las plantas pueden resultar de factores bióticos o abióticos. Las enfermedades causadas por factores bióticos son también conocidas como enfermedades infecciosas y son causadas por patógenos. Los patógenos pueden ser hongos, bacterias, fitoplasmas, virus, protozoarios y nemátodos (Trigiano *et al.*, 2004). Existe un sinnúmero de factores abióticos que pueden afectar los procesos fisiológicos de las plantas, tales como sustancias tóxicas inmersas en el aire, agua o suelo, sequía, temperatura, oxígeno, nutrientes minerales, CO₂, luz, entre otros (Trigiano *et al.*, 2004).

Para que una enfermedad se desarrolle en una planta es necesaria la presencia simultánea de varios factores: un hospedero susceptible, un patógeno virulento y condiciones ambientales que favorezcan a la enfermedad. La interacción de estos tres factores se conoce como el triángulo de la enfermedad, y determina la magnitud de la enfermedad (Agrios, 2010). Para diagnosticar una enfermedad en una planta, primeramente es necesario establecer si la enfermedad es causada por algún factor ambiental o por un patógeno. Una vez identificado el factor, en caso de ser éste un patógeno, es necesario aislar al agente biótico causal y caracterizarlo (Agrios, 2010).

En el campo de la fitopatología uno de los principios fundamentales para identificar certeramente un agente causal es la prueba de patogenicidad. La patogenicidad es definida

como “la alteración que ocasiona un parásito sobre una o varias de las funciones de la planta” (Agrios, 2010). Pruebas de patogenicidad fueron reconocidas como necesarias por Koch en el año 1884 en los inicios de la microbiología (Parry, 1990), para confirmar la identidad del agente biótico causal de una enfermedad. Los postulados de Koch son una serie de condiciones que deben cumplirse secuencialmente, y consisten en:

1. El organismo debe estar consistentemente asociado con el síntoma de la enfermedad.
2. El organismo debe ser aislado y criado en cultivo puro.
3. El organismo debe ser inoculado en hospederos saludables de la misma especie de la cual fue originalmente aislado y debe mostrar los mismos síntomas originalmente observados.
4. El organismo debe ser re-aislado y debe presentar las mismas características de la misma manera que el organismo originalmente aislado.

Recientemente se identificó al agente causal de la PC en palma africana en Colombia como *P. palmivora* (Torres *et al.*, 2010). En el Ecuador aún no se ha reportado oficialmente la causa de PC en palma africana ni se ha registrado su presencia en palmito. Sin embargo, en febrero del 2014, investigadores de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE, M. E. Ordóñez, R. Montufar y C. Keil) visitaron plantaciones de palmito en Santo Domingo de los Colorados (DANEC) donde se encontró plantas de palmitos con síntomas de PC. Pruebas preliminares de aislamiento en medio selectivo para *Phytophthora*, observación de características morfológicas del organismo, al igual que pruebas con un kit comercial de identificación de especies de *Phytophthora* (*Phytophthora* InmunoStrip® Tests, Agdia Inc. IN, USA),

evidenciaron la presencia del microorganismo. Adicionalmente, se confirmó la especie de *Phytophthora* como *palmivora* mediante secuenciación de la región ITS del ADNr. Estos datos preliminares sirven de base para sugerir que la PC en palmito puede ser causado por infecciones de *P. palmivora*. Para poder identificar certeramente al patógeno es necesario completar los postulados de Koch. La información que se obtenga sobre el agente causal de PC es indispensable para desarrollar estrategias de control de la enfermedad en palmito.

3.6 OBJETIVOS

3.6.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar a *Phytophthora palmivora* como agente causal de la pudrición del cogollo en palmito (*Bactris gasipaes*) en el Ecuador.

3.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar la identidad del agente causal de la pudrición de cogollo en el palmito (*Bactris gasipaes*) completando los postulados de Koch mediante inoculación, re-aislamiento e identificación de aislados de *P. palmivora* en plántulas de *B. gasipaes*.
- Identificar el patógeno mediante la observación microscópica de caracteres, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciamiento de la región ITS (espaciador transcrito interno) del ADNr.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SIEMBRA DE SEMILLA

Se obtuvo 20 infrutescencias de *B. gasipaes* en el mercado central del Tena, Ecuador. Se trasladaron las infrutescencias a la Estación Científica Yasuní (ECY) de la PUCE en la provincia de Orellana, en donde se procedió a retirar el mesocarpio y epicarpio del fruto. Una vez obtenidas las semillas estas recibieron un tratamiento de baño de agua, entre 35 y 40 °C, por 12 horas. Seguidamente, se distribuyó las semillas en 11 fundas de polifan de 30x40 cm. Las fundas contenían un kilogramo de aserrín previamente esterilizado. Se sembraron distintos números de semilla por cada funda de polifan: una funda con 500 semillas, dos fundas con 250, tres fundas con 150, una con 183 semillas y cuatro fundas con 100 semillas. Las fundas con semillas fueron colgadas a 2 metros de altura en una plataforma que sostiene un techo de *Eternit* a las afueras del invernadero de la ECY, el cual brindó protección parcial a las fundas para la germinación de las semillas.

Dos meses después de poner a las semillas a germinar, éstas se trataron con el fungicida *Celest* (Syngenta, Suiza) para eliminar hongos presentes. Para el tratamiento con *Celest* se sacó todas las semillas de cada funda, se las introdujo en una funda grande de polifan perforada, se sumergió la funda con semillas en el fungicida y después de cinco minutos se retiró y escurrió la funda. Una vez tratadas las semillas, se las colocó en nuevas fundas con aserrín esterilizado de la siguiente manera: una funda con 13 semillas germinadas, una funda con 107 semillas, una funda con 109 semillas, una funda con 134 semillas, una funda con 137 semillas, cuatro fundas con 150 semillas cada una y dos fundas de 300 semillas. Adicionalmente, se adquirieron 250 plántulas de 2 semanas de

edad en los viveros de Ambyagro, ubicados en la ciudad de Santo Domingo de los Colorados, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. Las semillas germinadas por parte de Ambyagro fueron también adquiridas en la ciudad del Tena, provincia de Napo. Las plántulas fueron trasladadas a la ECY. En total 400 plántulas (250 de Ambyagro y 150 germinadas en la ECY) fueron sembradas en vasos de 32 onzas en tierra abonada esterilizada y colocadas en un invernadero.

4.2 INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS

Se utilizaron 350 plántulas de dos hojas en el experimento: 175 plántulas fueron inoculadas con zoósporas de *P. palmivora* a una concentración de 30.000 zoósporas/ml obtenidas a partir de cultivos puros de *P. palmivora* albergados en el laboratorio del Fungario QCAM de la PUCE y 175 se utilizaron como control negativo inoculadas con agua destilada estéril. Se contó con dos cepas de *P. palmivora* obtenidos previamente de fincas comerciales de palmito en plantas que presentaban los síntomas de PC en la ciudad Santo Domingo de los Colorados.

Para obtener zoósporas del patógeno para la inoculación de las plántulas, se cubrió con agua destilada estéril la superficie de micelio de 38 placas Petri con medio de cultivo con jugo vegetal V8 Campbells® que contenían cultivos puros de *P. palmivora* (Anexo 1). Se dejó reposar las cajas por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se vertió el sobrenadante en una probeta. Se realizó el conteo de zoósporas por medio de una cámara Neubauer para determinar la concentración de zoosporas por mililitro (Figura 4).

Se utilizaron diferentes métodos de inoculación de las plántulas para asegurar la infección. Los sitios de inoculación fueron el suelo, el cogollo y las hojas. Se aplicó diferentes tratamientos con o sin herida al tejido. Cada tratamiento se describe en la Tabla 2. Se inocularon 25 plántulas por tratamiento con la suspensión de zoósporas, y además 25 plántulas fueron inoculadas con agua destilada estéril como control. Los tratamientos fueron: 1.1 Inoculación del suelo con una suspensión de 1ml de zoósporas junto al tallo de la plántula; las plántulas fueron heridas con dos pinchazos en el tallo a la altura del suelo con una aguja estéril; 1.2 Inoculación del suelo con una suspensión de 1ml de zoósporas junto al tallo de la plántula en plántulas sin heridas (Figura 5). Los controles negativos fueron 1.1T (heridas) y 1.2T (no heridas). Tratamientos 2.1 Inoculación del cogollo con una suspensión de 0,5ml de zoósporas por medio de inyección en la zona meristemática; 2.2 Inoculación del cogollo con una suspensión de 1ml de zoósporas sobre la hoja no expandida. Los controles negativos fueron 2.1T (con inyección) y 2.2T (sobre el cogollo) (Figura 6). Tratamientos 3.1 Inoculación en hojas con una suspensión de 0.5ml de zoósporas por medio de inyección en la vena central; 3.2 Inoculación en hojas con una suspensión de 1ml de zoosporas sobre la abrasión del tejido de la hoja; 3.3 Inoculación en hojas con una suspensión de 1ml de zoósporas por riego sobre la hoja (Figura 7). Los controles negativos fueron 3.1T (Inyección en la vena central), 3.2T (abrasión del tejido de la hoja) y 3.3T (sobre la hoja).

Las plántulas fueron examinadas a diario luego de la inoculación durante 3 días, luego a la segunda y tercera semana. Se registró la humedad y temperatura ambiental por medio de un datalogger, cada cinco minutos, durante 24 días de duración del ensayo (Anexo 2).

Las plántulas con síntomas de decoloración de la flecha y hojas jóvenes, posible marchitamiento de la flecha, clorosis e inclusive plántulas con las hojas disecadas fueron seleccionadas y se tomaron muestras de tejido infectado para de aislar el patógeno, según el método descrito por Torres *et al.*, 2010.

4.3 AISLAMIENTO DE *P. palmivora*

Se tomaron muestras de 0,5 cm² de tejido infectado del meristemo apical (cogollo), que incluía parte de tejido infectado y parte de tejido sano de la planta. El tejido fue colocado dentro de una papaya que fue previamente desinfectada en la superficie, primero con agua y jabón, luego con un baño de hipoclorito de calcio al 10% y enjuagada con agua destilada estéril. Se realizó un corte circular de 2 cm de diámetro y 1cm de profundidad en la papaya, se retiró el pedazo cortado y se colocó el tejido infectado de palmito dentro del orificio de la papaya, luego se volvió a colocar el pedazo de papaya y se selló el corte con parafilm (Figura 8). Las papayas fueron incubadas a temperatura ambiente hasta la aparición de síntomas de infección.

Una vez observados síntomas de pudrición y crecimiento micelial alrededor del corte circular en la papaya, se tomó un pedazo de tejido de 1 cm² que incluyó tejido infectado y tejido sano de papaya, y se lo pasó por hipoclorito de calcio al 2% por 10 segundos, se lo enjuagó en agua destilada estéril dos veces, y se secó el tejido en papel estéril. Se colocó los pedazos de tejido infectado en placas Petri que contenían medio V8 PARPH (Figura 8) (Anexo 1). Las placas inoculadas fueron incubadas a 25 °C en la oscuridad. El medio V8 PARPH es un medio de cultivo selectivo para especies de *Phytophthora* (Ferguson y Jeffers, 1999) ya que contiene los siguiente antibióticos:

pimaricina (fungicida), ampicilina (bactericida), rifamicina (bactericida), pentacloronitrobenzeno (PCNB) (fungicida) e hymexazol, este último inhibe el crecimiento de *Pythium* que es un género relacionado a *Phytophthora* (Drenth y Sendall, 2001). Una vez que el crecimiento de *P. palmivora* en el medio V8 PARPH fue evidente, se re-aisló al patógeno en medio V8 sin antibiótico obteniendo finalmente cultivos puros de *P. palmivora*.

4.4 IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO

Para la identificación del patógeno se utilizó el test comercial *Phytophthora* Agdia ImmunoStrip®tests (Agdia Inc., IN, USA), según las indicaciones del fabricante. La prueba detecta la presencia del género *Phytophthora* a partir de tejido infectado macerado. La prueba se realizó para muestras de los tratamientos 1.1, 2.1, 3.2, y 2.1T. Si se observan dos bandas de color al realizar la prueba, esto indica la presencia de *Phytophthora*, si solo se evidencia una banda de color, esto implica que la prueba fue exitosa pero no hay presencia de *Phytophthora*.

A partir de los cultivos puros obtenidos en V8, se extrajo el ADN de las muestras para una identificación molecular. Para la extracción de ADN se tomó un poco de micelio con un palillo estéril, se lo colocó en 200 µl de agua milliQ e incubó a 95 °C por 5 minutos. Se utilizó 1 µl de la solución para la PCR. Se amplificó mediante PCR a la región ITS del ADNr utilizando el *primer* ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') específico para *Phytophthora*, y el *primer* e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Grünwald *et al.*, 2011). La reacción de amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, con 1 ng/µl ADN, 1X PCR Buffer (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂

(Invitrogen), 0,2 mM dNTPs (Invitrogen), 0,2 μ M de cada cebador y 0,1 U/ μ l Taq Polimerasa (Invitrogen). La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Multigene Labnet), con la siguiente configuración: 1 ciclo de 94 °C durante un minuto, 1 ciclo de 72 °C por 10 minutos y 4 °C infinito para la conservación de las muestras (Grünwald *et al.*, 2011). Los productos de la amplificación fueron visualizados por electroforesis en agarosa según los métodos de Fierro (2014). Los productos de PCR fueron enviados a la compañía Macrogen Inc. (Seoul, Korea) para su secuenciamiento. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias disponibles en GenBank con la herramienta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Anexo 3)

Para la identificación morfológica se observaron esporangios y zoósporas bajo el microscopio de luz. Se tomaron fotografías microscópicas con el equipo Infinity 2 y su software, que permitió medir en un aumento 40x las estructuras en micras (μ m) del ancho y largo del esporangio, y del largo del pedicelo del mismo. Se tomaron medidas de 20 esporangios al azar. Además, se consideró el tipo de crecimiento micelial de *P. palmivora* en medio V8, que también es característico de la especie (Brasier y Griffin, 1979).

5. RESULTADOS

5.1 SEMILLAS DE *Bactris gasipaes*

Al cabo de cuatro meses, de las 2038 semillas puestas a germinar se obtuvo un total de 392 plántulas en buen estado. El éxito de germinación fue de 19,28%. En el experimento se utilizó en total 350 plántulas, 175 plántulas germinadas en la EYC y 175 plántulas adquiridas de Ambyagro. La selección de las plántulas se basó en la presencia de dos hojas en buen estado, lo que permitió homogeneidad en el experimento.

El promedio de la temperatura en el invernadero durante el transcurso del ensayo fue de 25,4 °C, con una temperatura máxima de 34,5 °C y una temperatura mínima de 21,4 °C. La humedad relativa promedio fue de 95,8%, con una humedad relativa máxima de 100% y mínima de 58,1% (Anexo 2).

5.2 INOCULACIÓN Y REAISLAMIENTO

Los tratamientos 1.1, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, y 3.3 presentaron síntomas de PC. Los síntomas fueron la decoloración de las hojas (clorosis), marchitez y necrosis del tejido meristemático (Figura 9-10). La marchitez de las hojas se observó al cabo de 3 días después de la inoculación. Ninguna plántula del tratamiento 1.2 presentó síntomas de enfermedad (Tabla 2). Ninguna plántula de control negativo (1.1T, 1.2T, 2.1T, 2.2T, 3.1T, 3.2T, 3.3T) presentó síntomas de PC.

El porcentaje de plántulas infectadas para los tratamientos con síntomas de PC fue: 1.1 Inoculación del suelo 12%, 2.1 Inoculación del cogollo por inyección en la zona meristemática 80%, 2.2 Inoculación del cogollo sobre la hoja no expandida 4%, 3.1

Inoculación en hojas por inyección en la vena central 12%, 3.2 Inoculación en hojas sobre abrasión del tejido de la hoja 12% y 3.3 Inoculación en hojas por riego sobre la hoja 28%. El éxito de re-aislamiento de *P. palmivora* fue entre 66.66% a 100%, para los 5 tratamientos.

5.3 IDENTIFICACIÓN DE PHYTOPHTHORA PALMIVORA

5.3.1 KIT DE IDENTIFICACIÓN PARA PHYTOPHTHORA AGDIA IMMUNOSTRIP

Las pruebas realizadas para confirmar la presencia de *Phytophthora* spp. con Agdia ImmunoStrip® tests fueron exitosas. La prueba fue positiva para los tratamientos 1.1, 2.1 y 3.2, la cual mostró dos bandas de color, la superior que indicó que la prueba se realizó con éxito y la banda inferior que indicó la presencia del patógeno. Para el tratamiento 2.1T (control negativo) la prueba fue negativa para la presencia de *Phytophthora* como se esperó y mostró únicamente la banda de color superior (Figura 11).

Se amplificó exitosamente la región ITS para aislamientos correspondientes a los tratamientos 1.1, 2.1, 2.2, 3.1 y 3.2 (Figura 12). La secuencia obtenida para las cinco muestras fue idéntica. Al realizar la búsqueda mediante la herramienta BLASTn en GenBank se obtuvo una cobertura e identidad del 100% con la muestra con número de accesoión KR818208 correspondiente a *P. palmivora*.

El tamaño promedio para 20 esporangios fue de 50,59 x 29,68 μm con una desviación estándar del largo de los esporangios de 7,44 μm y del ancho de 7,01 μm

(Figura 13) (Anexo 4). La longitud promedio del pedicelo fue de 4,75 μm (Figura 14). Las zoósporas presentaron un tamaño promedio de 12,49 μm (Figura 15).

La morfología del crecimiento de la colonia del patógeno en agar V8 fue de patrón estelado, con micelio aéreo blanquecino e hifas coraloides (Figura 16).

6. DISCUSIÓN

Phytophthora palmivora fue identificada como el agente causal de la pudrición del cogollo en palmito (*B. gasipaes*) en el Ecuador. Los postulados de Koch fueron completados exitosamente, siendo esta investigación parte del primer reporte en Ecuador de pudrición de cogollo en *B. gasipaes* causado por *P. palmivora* (Anexo 5).

Los síntomas encontrados en las plántulas con PC concordaron con los reportados en la literatura (Elliot, 2005). Seis de los siete tratamientos inoculados con zoósporas de *P. palmivora* presentaron síntomas de pudrición de cogollo, y se obtuvo cultivos puros de cinco tratamientos (1.1 Inoculación del suelo, 2.1 Inoculación del cogollo por inyección en la zona meristemática, 2.2 Inoculación del cogollo sobre la hoja no expandida, 3.1 Inoculación en hojas por inyección en la vena central, 3.2 Inoculación en hojas sobre abrasión del tejido de la hoja (Figura 17). El éxito de re-aislamiento fue elevado, entre el 66,66% - 100%. Sin embargo, en el caso del tratamiento 3.3 Inoculación en hojas por riego sobre la hoja, este presentó síntomas de pudrición, pero el cogollo presentó necrosis avanzada, lo que hizo imposible aislar el patógeno de este tratamiento. Se sugiere que para el aislamiento del patógeno a partir de tejido infectado, se lo haga en ausencia de necrosis avanzada, ya que el éxito del aislamiento se reduce.

Se utilizaron distintos tratamientos de inoculación de las plántulas en el invernadero debido a que no se conoce el proceso de infección de *P. palmivora* en palmito. La metodología aplicada buscó emular diferentes escenarios a través de los cuales *P. palmivora* podría infectar al hospedero *B. gasipaes*. Los resultados obtenidos sugieren que el proceso más eficiente del ingreso del patógeno al tejido podría darse a través de una

herida a la altura del cogollo (tratamiento 2.1), ya que este fue el tratamiento con mayor número de plantas infectadas. Es posible que la herida en el tejido en el campo pueda ser producida por un insecto con la capacidad de penetrar en el tejido de la planta para alimentarse de ella. Según estudios realizados en Colombia por Ruiz *et al.* (2013) se identifica a coleópteros de la familia Curculionidae *Metamasius hemiptera* (nombre común: taladradores del tallo) y *Rhynchophorus palmarum* (nombre común: Picudo de la palma) como plagas de *B. gasipaes*. Estos insectos podrían causar heridas en el tejido del cogollo facilitando la entrada del patógeno. Es posible, además, que heridas mecánicas durante el manejo del cultivo favorezcan la infección. Por ejemplo, para cosechar el palmito se utiliza machete para retirar las espinas que protegen al palmito, una vez retiradas las espinas se procede a talar el palmito desde la base. La variedad de *B. gasipaes* var. *gasipaes* que es utilizada para el cultivo de palmito es cespitosa lo cual beneficia a los palmicultores ya que una vez cosechado el palmito, el mismo individuo de *B. gasipaes* produce nuevos brotes que le permiten al palmicultor cosechar el mismo individuo durante aproximadamente 10 años (Salas *et al.*, 1997). Entonces, la forma de cosecha del palmito hiere a la planta dejándola con sitios vulnerables para la entrada de *P. palmivora*.

Los resultados también muestran que el proceso infeccioso podría darse a través del ingreso de zoósporas de *P. palmivora* por la hoja (tratamiento 3.3), el segundo tratamiento con mayor número de plantas infectadas. Este proceso infeccioso ha sido descrito en la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) (Sarria *et al.*, 2015), y podría ocurrir en *B. gasipaes*. La infección se produce cuando las zoósporas son atraídas hacia los tricomas de la hoja, una vez ahí las zoósporas forman apresorios que las mantienen fijas a los tricomas y eventualmente penetran el tejido (Sarria *et al.*, 2015). De igual manera, se sugiere que las zoósporas son capaces de penetrar los estomas de las hojas de *B. gasipaes* como ocurre

para otras especies de *Phytophthora*, como *P. infestans* en papa (Fry, 1998). Una vez penetrado el tejido, las zoósporas se enquistan y empieza la formación del micelio, momento en el cual las hifas empiezan a colonizar los espacios intercelulares de la hoja, seguido de una invasión intracelular hasta alcanzar los haces vasculares y finalmente colonizar todo el tejido del hospedero, matándolo (Sarria *et al.*, 2015).

Las condiciones ambientales de temperaturas cálidas y humedad relativa elevada dentro del invernadero favorecieron al desarrollo de la enfermedad. Estas condiciones ambientales son una de las tres condiciones necesarias para que se desarrolle cualquier enfermedad en plantas: hospedero susceptible, patógeno virulento y condiciones ambientales favorables (Agrios, 2010). Se cumplió con las tres condiciones ya que la infección de las plántulas de palmito fue exitosa. Adicionalmente, el tiempo de germinación de las semillas de *B. gasipaes* coincidió con lo reportado en la literatura, que varía de entre 38 a 133 días (Spiering *et al.*, 1994).

El uso de la prueba comercial Agdia ImmunoStrip®tests proporcionó evidencia adicional de que la causante de síntomas de PC fue una especie de *Phytophthora*. Este test contribuyó a la identificación *in-situ* del género previamente a las pruebas de laboratorio. El uso de esta prueba sería una herramienta práctica y fácil de usar en el campo para la detección de *Phytophthora* por parte de los agricultores. Otra ventaja de este tipo de pruebas serológicas es que permiten evitar la confusión al momento de diagnosticar la PC en la palma debido a que en lesiones avanzadas existe la presencia de patógenos oportunistas que ocultan al patógeno principal al momento de aislarlo. Debido a la presencia de patógenos oportunistas la PC en la palma aceitera, por ejemplo, es considerada como una enfermedad causada por un conglomerado de patógenos como *Thielaviopsis*

(hongo), *Erwinia* (bacteria), entre otros patógenos; sin embargo, *P. palmivora* es considerado como el patógeno causal de la enfermedad (Drenth *et al.*, 2013).

El uso de técnicas moleculares para la identificación de la especie fue exitoso. Los *primers* específicos ITS4/ITS6 para *Phytophthora* utilizados en la PCR permitieron identificar a *P. palmivora* al obtener una cobertura e identidad del 100% por medio del análisis BLASTn de la secuencia del ITS del ADNr de los aislamientos obtenidos con otras secuencias de *P. palmivora* disponibles en GenBank, lo cual confirmó la presencia del patógeno en el tejido infectado (Drenth *et al.*, 2006). El uso de herramientas moleculares como los *primers* especie- específicos representan una ventaja en la detección e identificación de patógenos que es un paso esencial previo al manejo y control de la enfermedad.

Las estructuras morfológicas de *P. palmivora* fueron detectadas exitosamente bajo el microscopio de luz y concordaron con la literatura. Así, las medidas de los esporangios fueron iguales a las reportadas por Kaosiri *et al.* (1978) y Christen *et al.* (1972). Esto permitió corroborar la identificación morfológica de *P. palmivora*.

Phytophthora palmivora resulta devastadora para sus hospederos por varias razones como: el heterotalismo, que permite la formación acelerada de las estructuras reproductivas como son las oósporas, dichas oósporas al ser generadas por reproducción sexual generan más diversidad genética lo que permite que nuevas razas evolucionen rápidamente, lo que a su vez implica que la especie, a través de sus nuevas razas, pueda desarrollar la capacidad de ser cada vez más virulenta. El enquistamiento de las zoósporas, y la formación de clamidosporas que presentan una pared gruesa, permiten al patógeno sobrevivir en

condiciones adversas como sequía y temperaturas bajas (Ribeiro, 2013). La capacidad de producir especies híbridas también es un factor importante a favor de *Phytophthora*, ya que significa una amenaza a los monocultivos e inclusive a los ecosistemas naturales. Aunque la hibridación es un evento no tan frecuente podría causar problemas impredecibles, tanto económicos como ecológicos (Érsek y Man, 2013).

Los resultados de este estudio también son un aporte para estandarizar el protocolo de aislamiento de *P. palmivora*, debido a que en una gran parte de estudios similares, el aislamiento del patógeno no ha sido exitoso. La mala identificación del agente causal repercute en el tratamiento de la enfermedad, ya que este no es eliminado, sino se dan tratamientos para eliminar agentes secundarios de la enfermedad. Una incorrecta identificación del agente causal también lleva al uso desmesurado de pesticidas, fungicidas y antibióticos que no logran controlar una enfermedad en una plantación ya que su eficacia está enfocada en eliminar agentes causales erróneos. Además, existen consecuencias negativas para el ambiente por el uso excesivo de estos químicos.

La confirmación de *P. palmivora* como el agente causal de la PC en *B. gasipaes*, mediante el cumplimiento de los postulados de Koch, es una contribución importante para diseñar medidas apropiadas para el control de la enfermedad en las plantaciones de palmito.

La devastación causada en el país por la PC ha traído graves consecuencias tanto económicas como sociales. Con este estudio se pretende plantear las bases para a futuro desarrollar estrategias de control de esta enfermedad en el palmito. Los resultados encontrados en esta investigación permitirán a futuras investigaciones resolver el problema

de la PC y entender la enfermedad conociendo certeramente el patógeno que ataca al hospedero.

7. LITERATURA CITADA

Agrios, G. 2010. Fitopatología (Segunda ed.). México DF, México: Limusa.

Ashby, S. 1929. Strains and taxonomy of *Phytophthora palmivora* Butler (*P. Faberi* Maubl.). **Transactions of the British Mycological Society** 14(1-2):18-38.

Blair, E., Coffey, D., Park, S., Geiser, D. y Kang, S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. **Fungal Genetics and Biology** 45(3):266-277.

Brasier, M. y Griffin, M. (1979). Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on Cocoa. **The British Mycological Society**. 58:111-143.

Brooks, F. 2005. *Phytophthora* Pests and Diseases. Recuperado el 19 de Enero de 2016, de American Samoa Brochures and Technical Reports:
http://www2.ctahr.hawaii.edu/adap/ASCC_LandGrant/Dr_Brooks/BrochureNo12.pdf

Christen, J. y Hohl, H. 1972. Growth and ultrastructural differentiation of sporangia in *Phytophthora palmivora*. **Canadian Journal of Microbiology** 18(12):1959-1964.

Drenth, A. y Sendall, B. 2001. *Practical guide to detection and identification of Phytophthora*. Recuperado el 28 de Febrero de 2016, de Centro Internacional de la Papa(CIP):

https://research.cip.cgiar.org/confluence/download/attachments/37192003/Drenth_Phytophthora_Practical_guide9.pdf?version=1&modificationDate=1273703622000

Drenth, A., Wagels, A., Smith, B., Sendall, B., Dwyer, C. y Irvine, G. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification. **Australasian Plant Pathology** 35: 147–159.

Drenth, A., Torres, G. y López, G. 2013. *Phytophthora palmivora*, la causa de la Pudrición del cogollo en la palma de aceite. **Palmas**. 34 (1):87-94.

Elliot, M. 2005. *Bud Rot of Palm*. Recuperado el 2 de Febrero de 2016, de Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP14400.pdf>

Érsek, T. y Man, W. 2013. *Phytophthora* Species Hybrids: a Novel Threat to Crops and Natural Ecosystems. En K. Lamour, *Phytophthora A Global Perspective* (págs. 37-47). Londres: Cabi.

Erwin, D. y Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 26-35.

- Ferguson, A. J. y Jeffers, S. N. 1999. Detecting multiple species of *Phytophthora* in container mixes from ornamental nurseries. **Plant Disease**. 83:1129-1136
- Fierro, F. 2014. Electroforesis de ADN. En A. Cornejo, A. Serrato, R. Beatriz, & M. Rocha, Herramientas moleculares aplicadas en ecología (págs. 27-51). Iztapalapa: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Fry, W. 1998. CORNELL UNIVERSITY VEGETABLE CROPS. Recuperado el 21 de Febrero de 2016, de Fact Sheet: Late Blight of Potatoes and Tomatoes: http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Potato_LateBlt.htm
- Fry, W. y Grünwald, N. 2010. The American Phytopathological Society (APS). Recuperado el 26 de 01 de 2016, de Introduction to Oomycetes: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.asp>
- [x](#)
- Garófalo, J. y McMillan, R. 2004. Thielaviopsis Diseases of Palms. **Proceedings of the Florida State Horticultural**. 117:324–325.
- Grünwald, N., Martin, F. y Larsen, M. 2013. Sequencing protocols. *Phytophthora-ID*, 1-9.
- Kaosiri, T., Zentmyer, A. y Erwin, D. 1978. Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao. **Canadian Journal of Botany** 56 (15):1730-1738.

- Mchaw, G. y Coffey, M. 1994. Isozyme diversity in *Phytophthora palmivora*: evidence for a southeast Asian centre of origin. **Mycological** ;98(9):1035- 1043.
- Montúfar, R. y Rosas J. 2013. Chontaduro/Chontilla *Bactris gasipaes*. En: Palmas ecuatorianas: biología y uso sostenible. Pg 77-89. Ed. Valencia R., Montúfar, R., Navarrete H., y Baslev, H. Publicaciones del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Ribeiro, O. 2013. A Historical Perspective of *Phytophthora*. En K. Lamour, *Phytophthora A Global Perspective* (págs. 1-10). Londres: Cabi.
- Runge, F., Telle, S., Ploch, S., Savory, E., Day, B., Sharma, R. y Thines, M. 2011. The inclusion of downy mildews in a multi-locus-dataset and its reanalysis reveals a high degree of paraphyly in *Phytophthora*. **IMA Fungus**. (2):2163-171.
- Ruiz, B., Martinez, M. y Medina, H. 2013. Reconocimiento de insectos potencialmente perjudiciales en *Bactris gasipaes* H.B.K. (Arecaceae) en el corregimiento El Tapón, municipio de Tadó-Chocó, Colombia. RIA. **Revista de investigación agropecuaria**, 196-206.
- Salas, R., Trujillo, A. y Manuel, C. 1997. El Pijigao. Fundación Polar, 85-97.
- Sarria, G., Martinez, G., Varon, F. y Drenth, A. 2015. Histopathological studies of the process of *Phytophthora palmivora* infection in oil palm. **European Journal of Plant Pathology** , 1-13.

- Schuman G. y D'Arcy. 2010. Essential Plant Pathology. The American Phytopathological Society. Segunda Edición. Estados Unidos, Minnesota.
- Spiering, H., Martins, M., Pizzinatto, M. y Lourencao, A. 1994. Seed Germination of Progenies of *Bactris gasipaes*: percentage, speed and duration. **Ornamental Palms** I, 157-165.
- Stamps, D., Waterhouse, G., Newhook, F. y Hall G. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. **Mycological papers**, CAB International, Wallingford Oxon.:162:1-28.
- Thines, M. 2013. Taxonomy and Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. En K. Lamour, *Phytophthora* A global perspective (págs. 11-18). Londres: Cabi.
- Torres G.A., Sarria G.A., Varon F., Coffey M.D., Elliott M.L. y Martinez G. 2010. First report of Bud Rot caused by *Phytophthora palmivora* on African oil palm in Colombia. **Plant Disease**. 94 (9): 1163.
- Trigiano, R., Windham, M. y Windham, A. 2004. Plant Pathology. Nueva York: CRC Press.
- Uchida, J. 2004. *Phytophthora* Diseases. Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders, 39-32.

8. FIGURAS

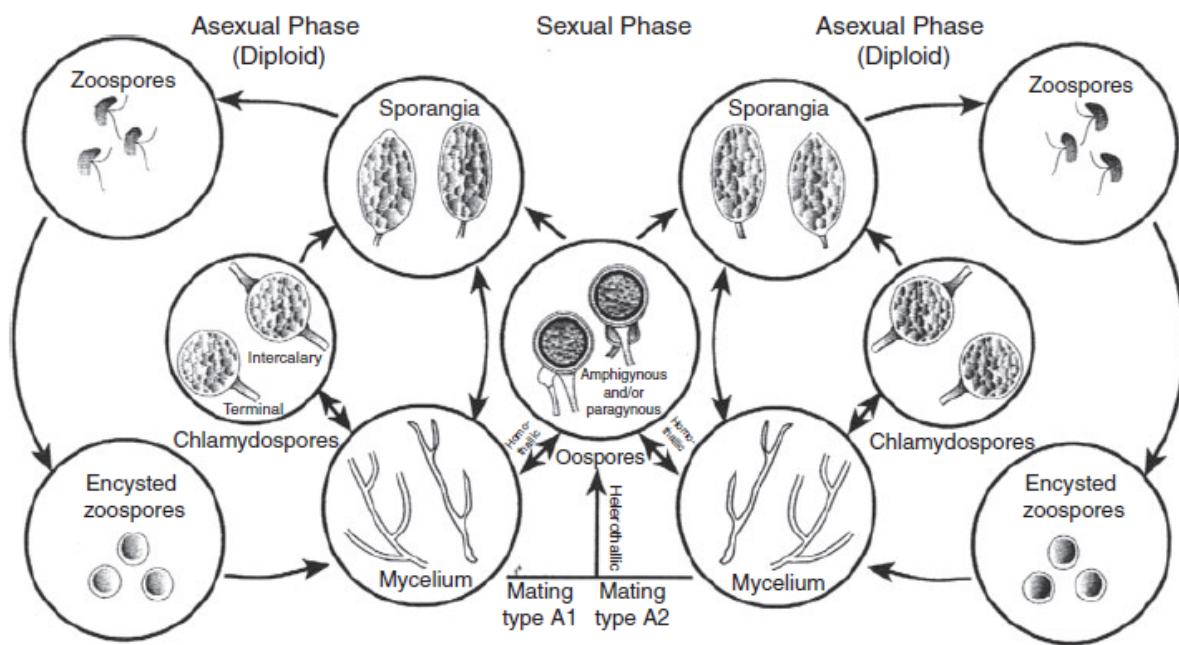


Figura 1. Representación del ciclo de vida de *Phytophthora* (tomado de Ribeiro, 2013).

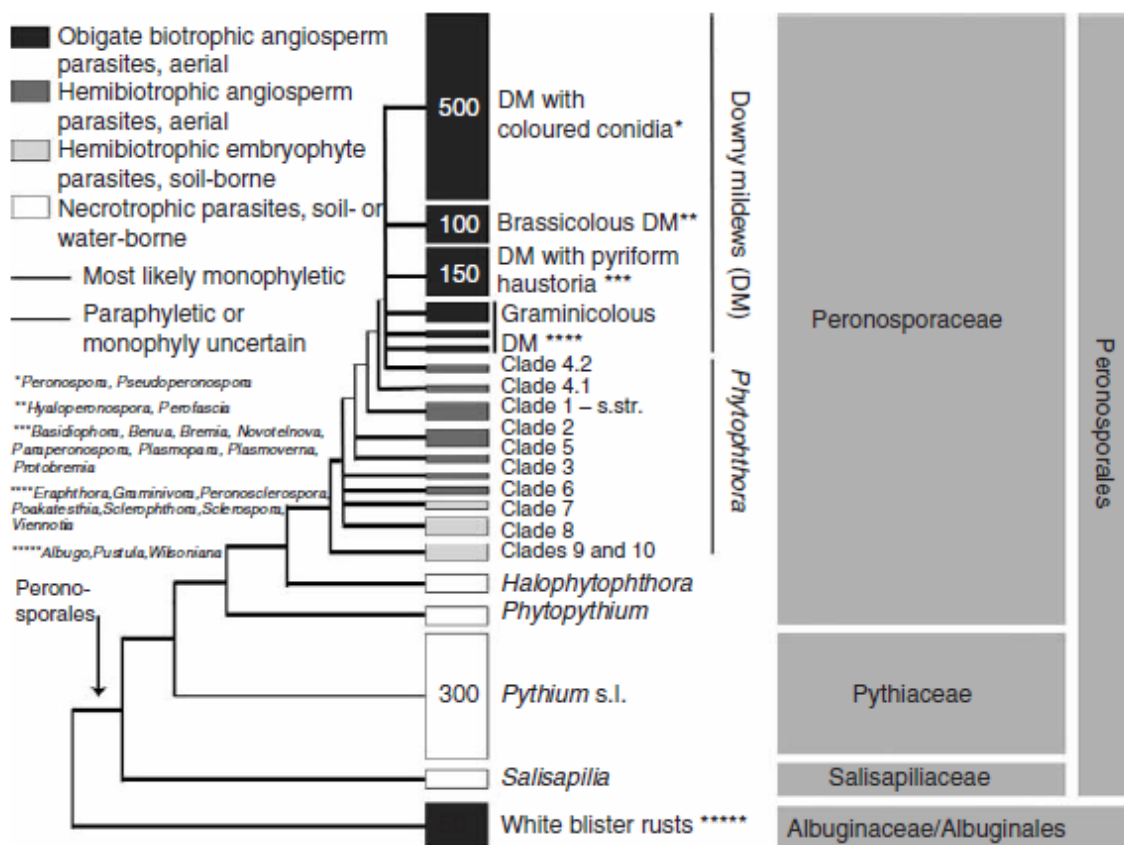


Figura 2. Esquema filogenético de la relación entre Peronosporales comparada con la roya blanca (Albuginaceae/Albuginales) a partir de secuencias de ITS concatenadas y secuencias de la subunidad grande del ribosoma. DM: Downy mildew (tomado de Thines, 2013).

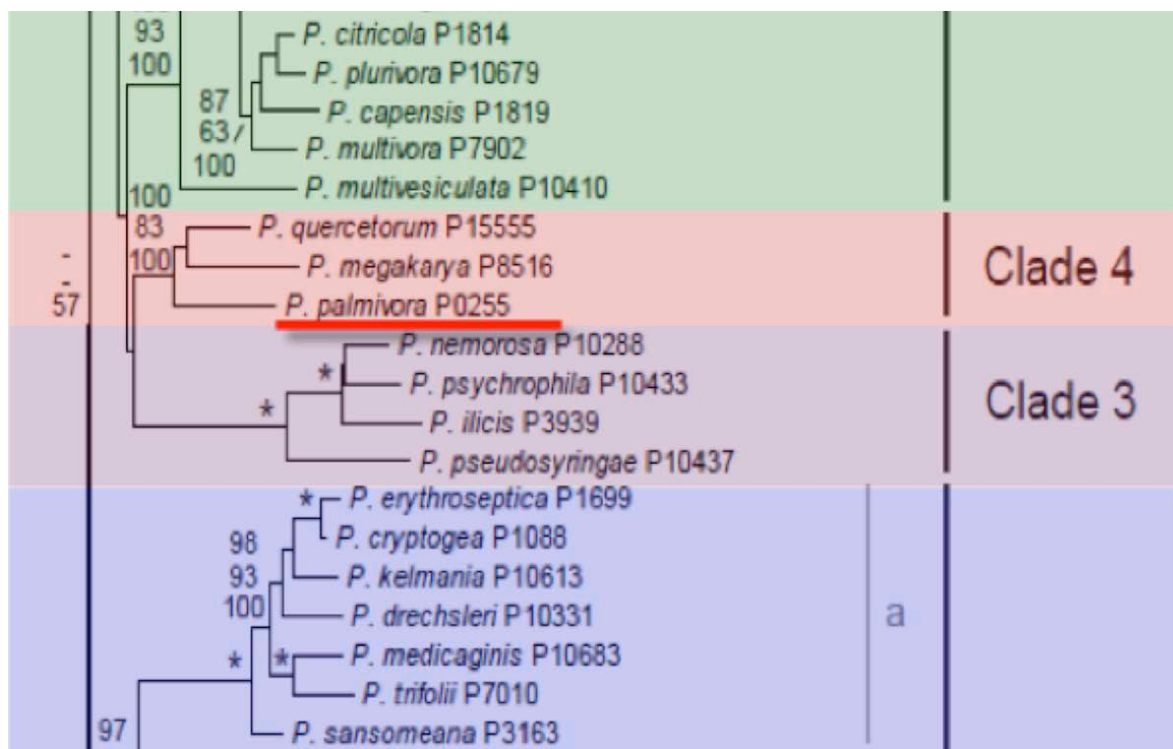


Figura 3. Análisis de máxima parsimonia de los genes concatenados *cox2*, *nad9*, *rps10*, y *secY* a partir de las especies de *Phytophthora* y *Phytophthora vexans* y *P. undulatum* como grupos externos (Blair *et al.* 2008).

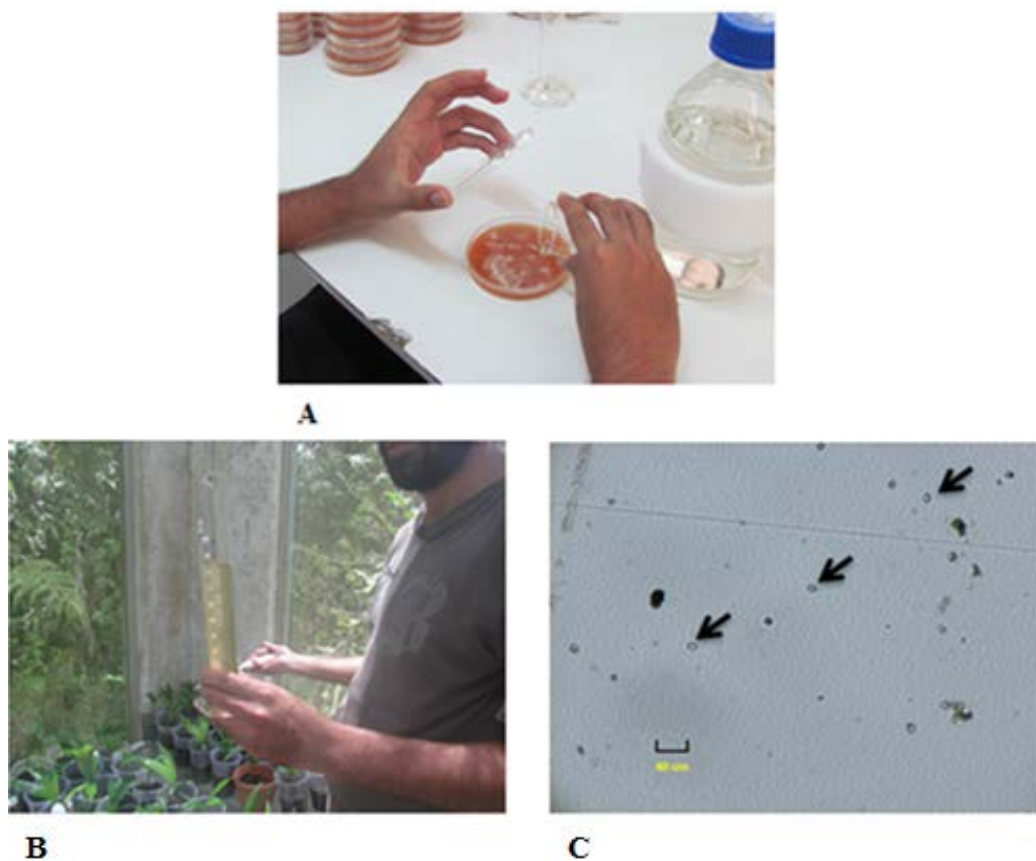


Figura 4. Obtención de suspensión de zoósporas de *Phytophthora palmivora* para la inoculación de plántulas de *Bactris gasipaes*. (A) Sumersión de micelio de cultivo puro de *P. palmivora* con agua destilada estéril (B) Suspensión de zoósporas en probeta con una concentración de 30.000 zoósporas/ml (C) Zoósporas bajo microscópio de luz, señaladas con flecha negra. Aumento 40X.

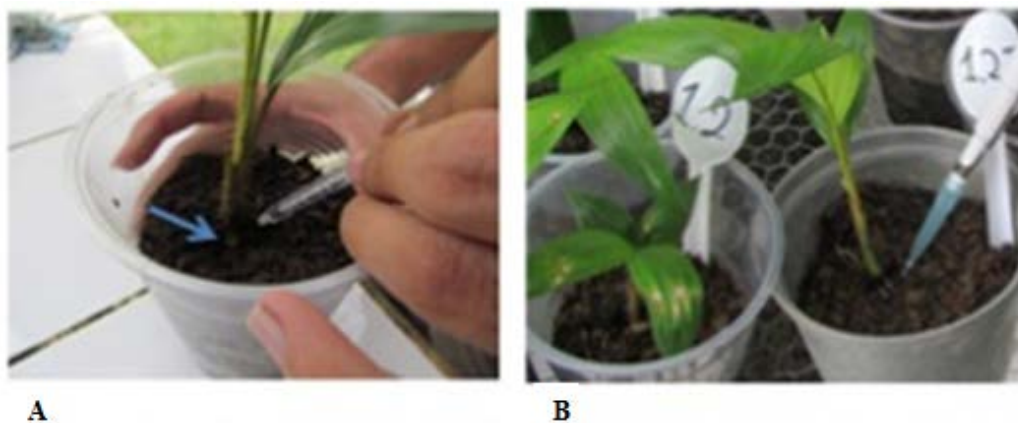


Figura 5. Tratamientos de inoculación del suelo. (A) Tratamiento 1.1: Aguja estéril realizando dos heridas (flecha) al nivel del suelo para posterior inoculación de *P. palmivora*. (B) Tratamiento 1.2: Inoculación con de *P. palmivora*, tratamiento sin herida previa.

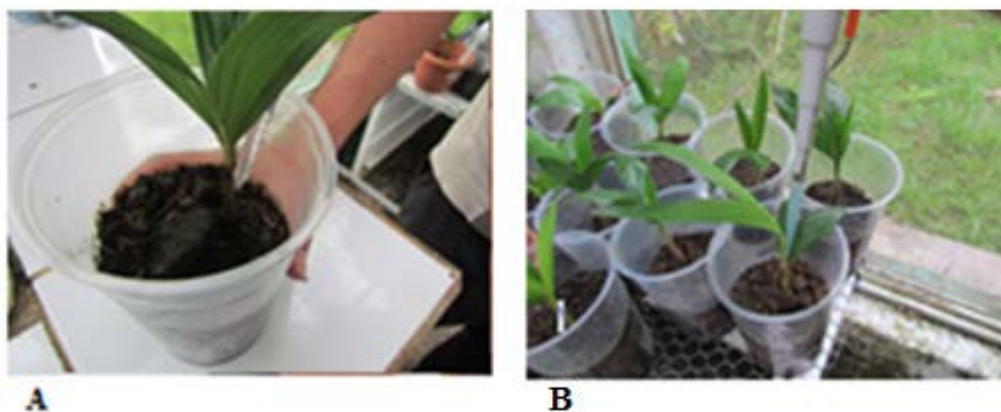


Figura 6. Tratamientos de inoculación del cogollo. (A) Tratamiento 2.1: Inyección con el concentrado de zoosporas de *P. palmivora* en la zona meristemática (B) Tratamiento 2.2: Inoculación con el concentrado de zoósporas de *P. palmivora* sobre la hoja no expandida.

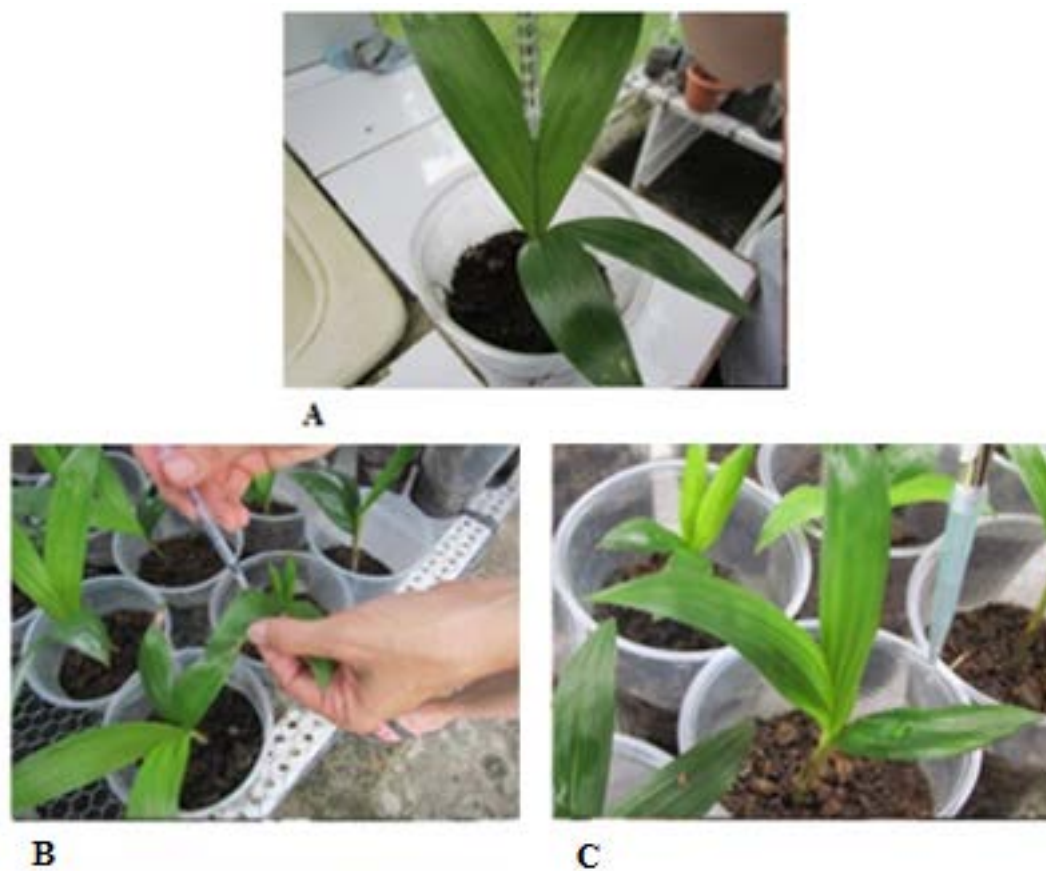


Figura 7. Tratamientos de inoculación de hoja. (A) Tratamiento 3.1: Inyección de la vena central (B) Tratamiento 3.2: Inoculación sobre abrasión del tejido de la hoja. (C) Tratamiento 3.3: Inoculación en la base de la hoja.

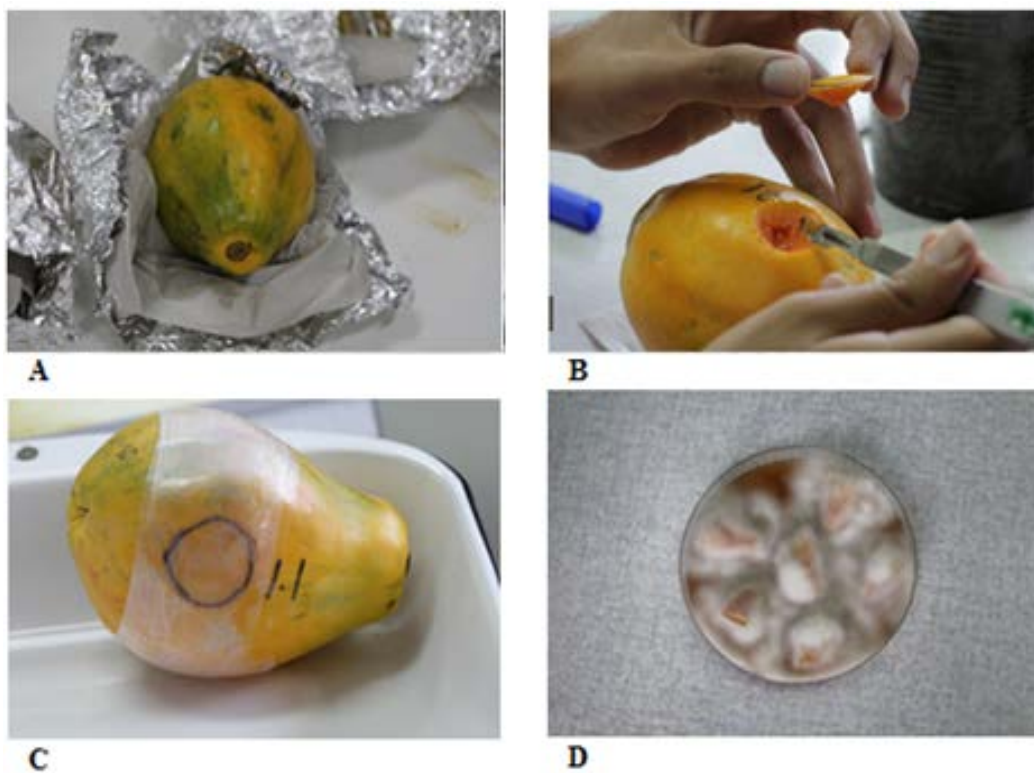


Figura 8. Aislamiento de *P. palmivora* en papaya. (A) Lavado de papaya. (B) Tejido infectado proveniente del cogollo colocado dentro de la papaya. (C) Sellado con parafilm después de la inoculación del tejido infectado. (D) Crecimiento de *P. palmivora* en medio V8 PARPH a partir de tejido de papaya infectado.

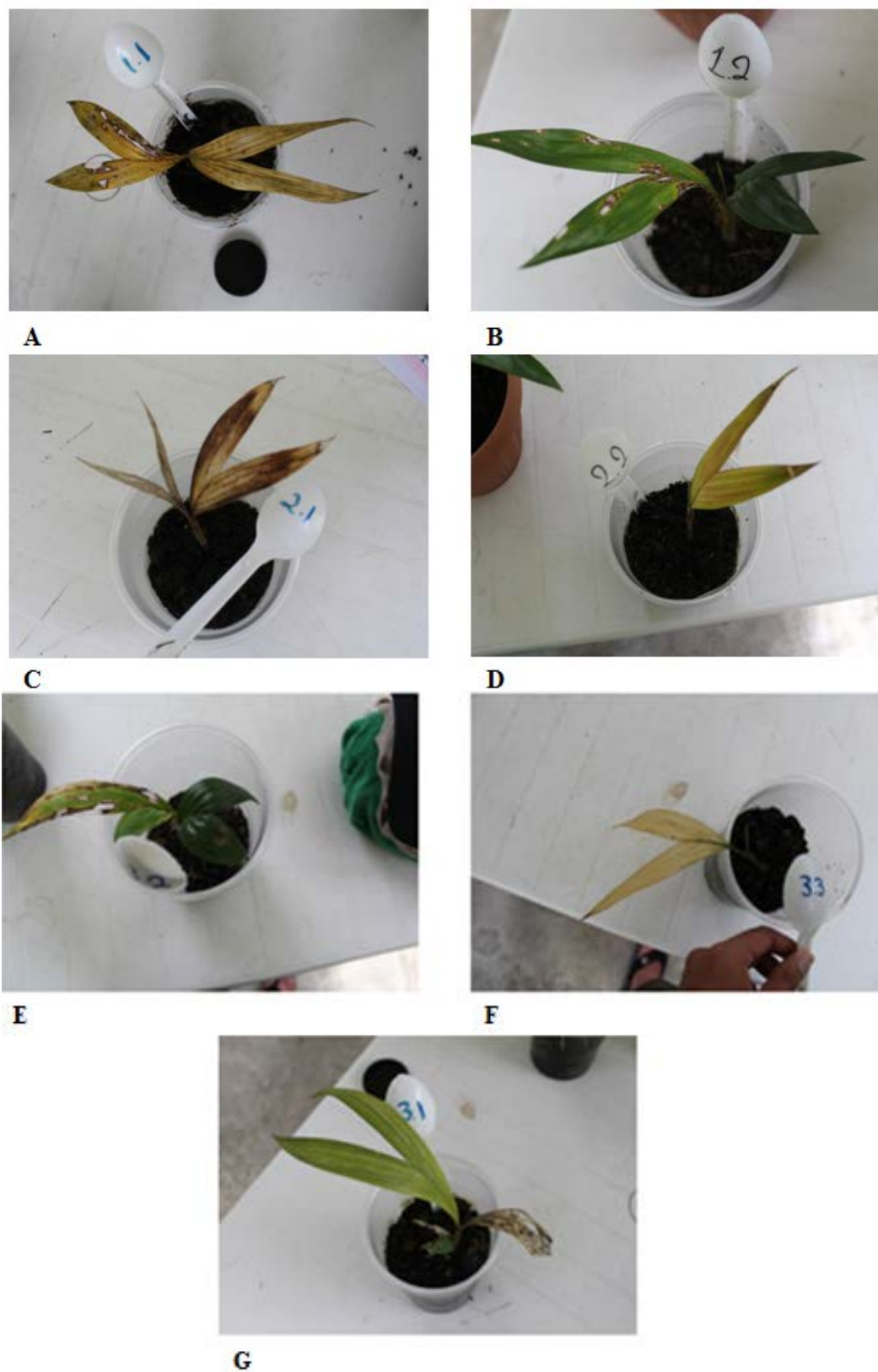


Figura 9. Síntomas foliares de PC en plántulas de *B. gasipaes* inoculadas con *P. palmivora*. (A) Tratamiento 1.1. (B) Tratamiento 1.2. (C) Tratamiento 2.1. (D) Tratamiento 2.2 (E) Tratamiento 3.2. (F) Tratamiento 3.3. (G) Tratamiento 3.1.

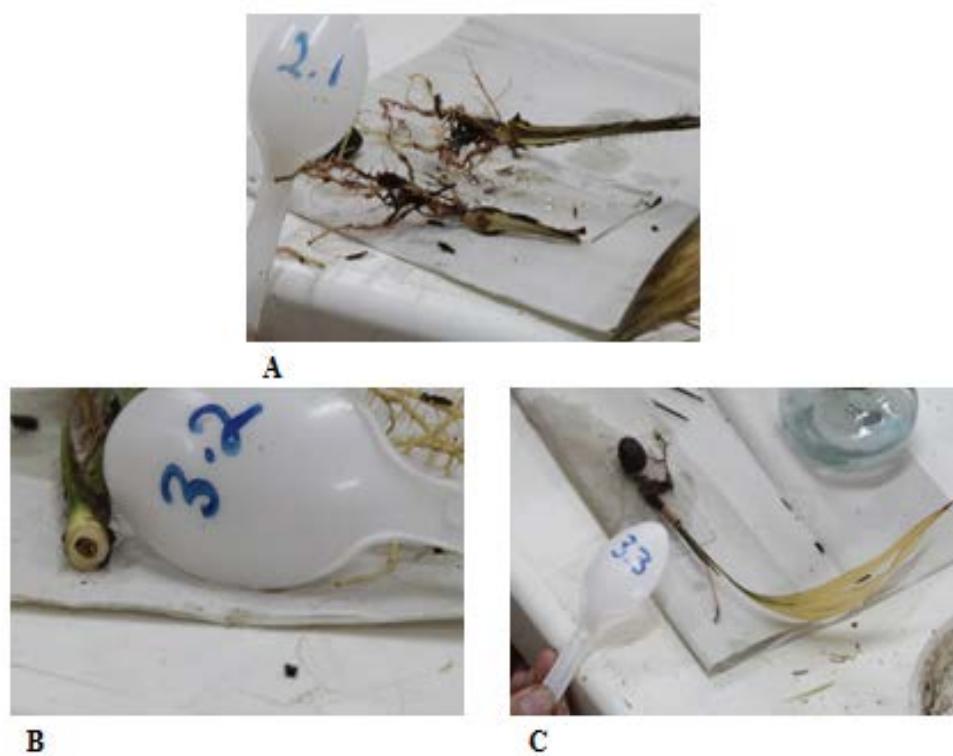


Figura 10. Síntomas de PC en plántulas de *B. gasipaes* inoculadas con *P. palmivora*. (A) Corte longitudinal de cogollo de *B. gasipaes* con síntomas de pudrición por infección de *P. palmivora* (tratamiento 2.1). (B) Corte transversal de cogollo de *B. gasipaes* con síntomas de pudrición por infección de *P. palmivora* (tratamiento 3.2). (C) Necrosis de tejido del cogollo, tallo, hojas y flecha de *B. gasipaes* por infección de *P. palmivora* (tratamiento 3.3).



Figura 11. Resultados de la prueba de identificación para *Phytophthora* con el kit Agdia ImmunoStrip. Pruebas correspondientes a los tratamientos 1.1, 2.1, y 3.2 fueron positivas para la presencia de *Phytophthora* (flecha violeta), para el tratamiento 2.1T correspondiente al control negativo no presentó dos bandas y únicamente mostró que la prueba fue exitosa (flecha color verde).

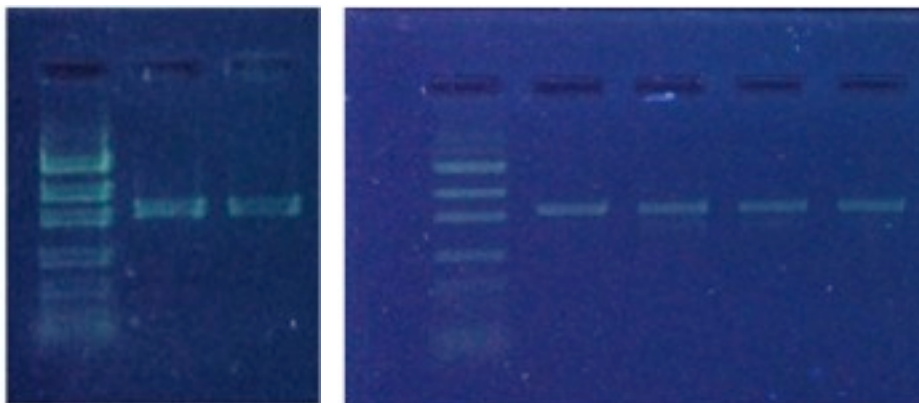


Figura 12. Electroforesis de los productos de amplificación de muestras de *P. palmivora* aisladas de plántulas infectadas de *B. gasipaes*. E: escalera (Low Mass Ladder -Invitrogen) y número de pares de bases para la tercera banda; Ctrl +: control positivo para *P. palmivora*; número de tratamiento sobre cada columna.



Figura 13. Medidas de esporangios de *P. palmivora* bajo aumento de 40X en microscopio de luz. Se muestra valores para largo y ancho.

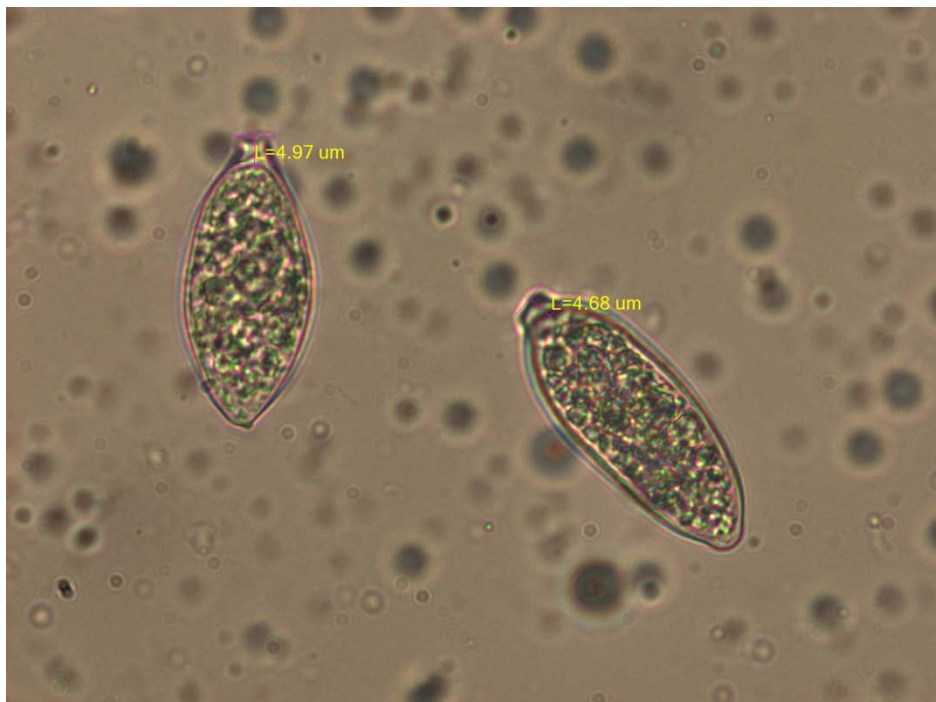


Figura14. Medidas de pedicelos de esporangios de *P. palmivora* bajo aumento de 40X en microscopio de luz. Se muestra valores para largo.

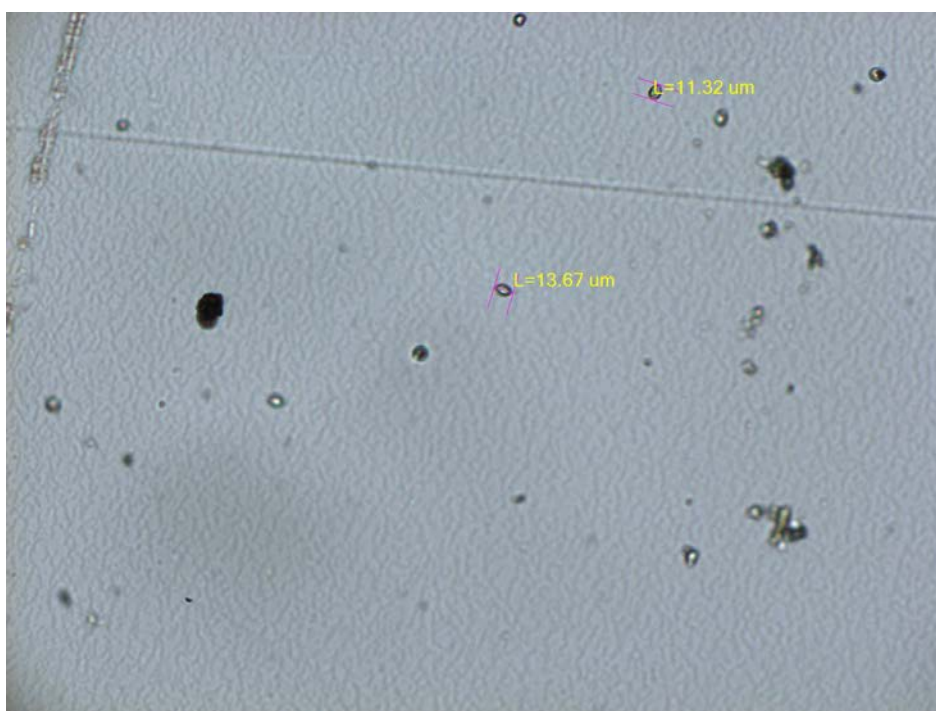


Figura15. Medidas de largo de zoósporas de *P. palmivora* bajo aumento de 40X en microscopio de luz.

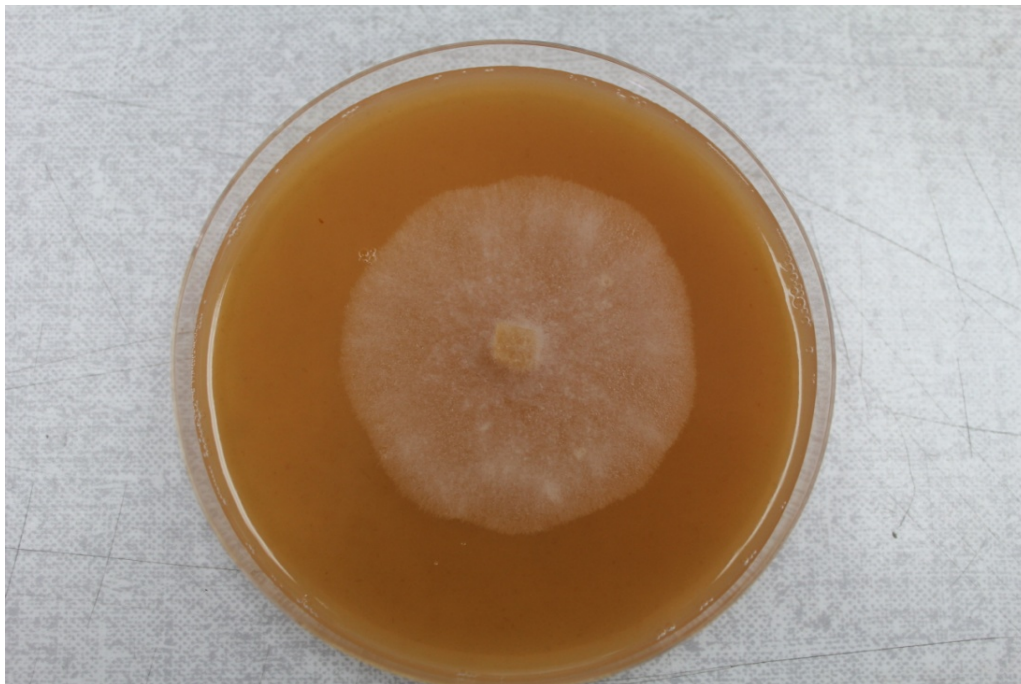


Figura 16. Crecimiento de *P. palmivora* en medio de cultivo V8

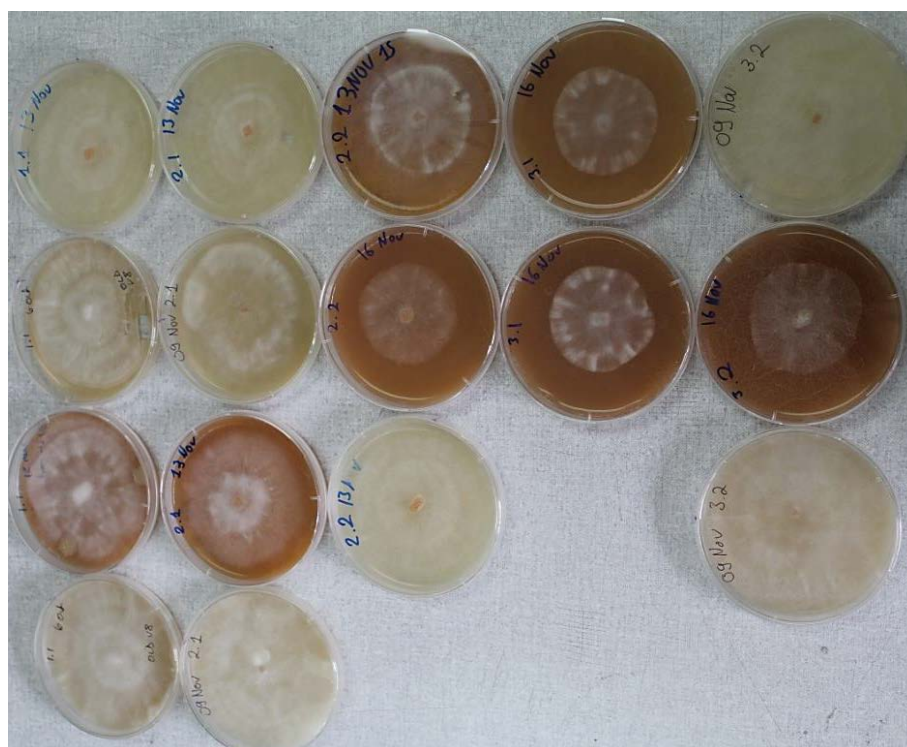


Figura17. Cultivos puros de *P. palmivora* de los tratamientos 1.1, 2.1, 2.2, 3.1, 3.2

9. TABLAS

Tabla 1. Métodos de inoculación de plántulas de *B. gasipaes* con *P. palmivora*.

Lugar de inoculación	No. Tratamiento	Cantidad de inóculo (30.000 zoósporas/ml)	Sitio de inoculación
1. Suelo	1.1	1 ml	Herida del tallo al nivel del suelo ¹
	1.2	1 ml	En el suelo junto al tallo
2. Cogollo	2.1	0,5 ml	Inyección en el cogollo
	2.2	1 ml	Sobre el cogollo
3. Hoja	3.1	0,5 ml	Inyección vena central hoja más grande
	3.2	1 ml	Abrasión sobre la hoja más grande ²
	3.3	1 ml	Sobre la hoja más grande

¹ Se hizo dos heridas por pinchazo con aguja estéril.

² Se raspó 5 veces cada hoja con aguja estéril.

Tabla 2. Número de plantas de *B. gasipaes* inoculadas con *P. palmivora* con síntomas de PC y éxito de aislamiento en cultivo puro.

Tratamiento		No. de plantas con síntomas de PC ^a	No. de plantas sintomáticas que se tomó para aislar en papaya	No. de aislados de <i>Phytophthora</i> en V8 PARPH	Éxito de aislamiento en V8 PARPH (%)	No. de cultivos puros obtenidos
1 Inoculación del suelo	1.1 Herida al nivel del suelo	3	3	3	100%	4
	1.2 Sin herida	0	0	0	-	0
2 Inoculación en cogollo	2.1 Inyección en el cogollo	20	20	19	95%	2
	2.2 Sobre el cogollo	1	1	1	100%	3
3 Inoculación en hojas	3.1 Inyección vena central	3	3	3	100%	3
	3.2 Abrasión en la hoja	3	3	2	66,66%	3
	3.3 Sobre la hoja	7	1	0	-	0

^a El número total de plantas inoculadas fue de 25.

^b No se mantuvieron todos los cultivos puros obtenidos por practicalidad de almacenamiento.

10. ANEXOS

Anexo 1. Receta de medio V8 Piramicina, Ampicilina, Rifamicina, Pentacloronitrobenzeno e Hymexazol (PARPH)

Para 1000ml

1. Medir 200ml de jugo V8 y poner en un Erlenmeyer de 1lt y añadir 600ml de agua destilada.
2. Añadir 2g de CaCO₃ y agitar hasta disolver.
3. Añadir 13,3g de agar
4. Autoclavar a 15psi por 20 min.
5. Dejar enfriar por 20 min.
6. Agitar mientras se dispensa en cajas Petri para evitar que el CaCO₃ se precipite.*

* Previo a dispensar el medio en cajas Petri se debe disolver todos los antibióticos en el medio.

Antibióticos*

Antibiótico	Cantidad para 1lt de V8-PARPH
Piramicina	5 mg
Ampicilina	250 mg
Rifamicina	10 mg
PCNB	50 mg
Hymexazol	50 mg

*Se utilizó la mitad de la concentración mostrada en esta receta estándar tomada de

<http://wiki.bugwood.org/PARPH-V8>.

Anexo 2. Datos de temperatura máxima y mínima por día registrados por datalogger

Fecha	Temp. Max (°C)	Temp Min (°C)	Temp. Promedio (°C)	Humedad relativa promedio diaria (%)
10/13/2015	28,295	23,448	25,872	95,083
10/14/2015	27,530	23,136	25,333	99,996
10/15/2015	26,109	22,753	24,431	100,000
10/16/2015	25,355	22,753	24,054	100,000
10/17/2015	29,615	22,753	26,184	99,986
10/18/2015	25,987	21,891	23,939	100,000
10/19/2015	25,598	21,485	23,542	100,000
10/20/2015	28,841	22,250	25,546	98,816
10/21/2015	34,150	22,681	28,416	90,527
10/22/2015	34,519	23,472	28,996	88,682
10/23/2015	33,053	24,291	28,672	87,050
10/24/2015	29,690	22,944	26,317	98,868
10/25/2015	27,186	22,824	25,005	100,000
10/26/2015	29,665	22,705	26,185	99,389
10/27/2015	29,315	22,369	25,842	99,555
10/28/2015	33,521	22,585	28,053	92,954
10/29/2015	33,469	22,178	27,824	88,600
10/30/2015	33,548	22,753	28,151	87,875
10/31/2015	32,639	23,400	28,020	89,640
11/1/2015	31,791	24,098	27,945	91,444
11/2/2015	28,171	23,304	25,738	99,792
11/3/2015	30,722	23,208	26,965	94,161
11/4/2015	26,965	23,857	25,411	99,769
11/5/2015	29,840	23,665	26,753	96,433

Anexo 3. Comparación de las secuencias obtenidas en el re-aislamiento con secuencias disponibles en GenBank con la herramienta Blastn, obteniendo 100% de cobertura e identidad. Las tres secuencias en el recuadro corresponden a los primeros aislados con los que se inculcó a los tratamientos.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora isolate Phv004a 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	KJ170145.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora isolate Phv001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	KJ170144.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora isolate 11_D 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	KJ170143.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain BBA 24/07 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	KJ755111.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain GHX-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	KF263691.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora isolate NRCPh-138 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	KF010307.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora isolate NRCPh-137 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	KF010306.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora isolate PP-08 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	KC415917.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora isolate PCO 46 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	HQ237477.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 24262 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111663.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 24325 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111660.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 26001 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111659.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 26320 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111655.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 28262 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111653.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 8923 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111651.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 9089 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111650.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 89148 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111649.1
<input type="checkbox"/> Phytophthora palmivora strain TARI 92140 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2	1513	1513	100%	0.0	100%	GU111648.1

Anexo 4. Medidas del largo y ancho de 20 esporangios escogidos al azar

	Largo (um)	Ancho (um)
Esporangio 1	56,34	39,09
Esporangio 2	33,50	22,25
Esporangio 3	56,20	22,29
Esporangio 4	55,61	21,83
Esporangio 5	45,93	22,95
Esporangio 6	53,50	24,13
Esporangio 7	41,47	21,12
Esporangio 8	45,11	22,15
Esporangio 9	52,23	21,44
Esporangio 10	55,18	32,11
Esporangio 11	62,79	34,34
Esporangio 12	59,01	32,81
Esporangio 13	47,49	26,66
Esporangio 14	63,53	45,59
Esporangio 15	50,58	32,80
Esporangio 16	52,86	30,30
Esporangio 17	54,88	30,84
Esporangio 18	50,21	32,44
Esporangio 19	44,59	29,25
Esporangio 20	41,35	34,01
Promedio	50,59	29,68

Anexo 5. Publicación aceptada en la revista internacional de fitopatología Plant Disease, febrero 2016

Disease Note

Diseases Caused by Oomycetes

First Report of *Phytophthora palmivora* Causing Bud Rot on Palmito (*Bactris gasipaes*) in Ecuador. M. E. Ordoñez, D. A. Jácome, C. B. Keil, and R. J. Montúfar, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Biológicas, Quito, Ecuador; and T. A. Evans, Department of Plant and Soil Sciences, University of Delaware, Newark 19716. *Plant Dis.* 100:1, 2016; published online as <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1354-PDN>. Accepted for publication 2 February 2016.

Palmito (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes* Kunth), the only native domesticated palm in the Neotropics, is used for its fruit, wood, and also for heart of palm. Ecuador is the largest exporter of palmito, with approximately 16,000 ha cultivated in 2009, representing 57% of the world's market (Montúfar and Rosas 2013). During two visits in February and May 2014 to palmito farms in the province of Santo Domingo de los Tsáchilas in western Ecuador, scattered plants with bud rot symptoms were observed. The affected plants showed chlorotic spear leaves, with necrosis inside the base of the stem on the meristematic tissue and tested positive for *Phytophthora* spp. using ImmunoStrip tests (Agdia Inc. Elkhart, IN, USA). Infected meristem tissue was baited on surface sterilized papaya and kept between 20 to 25°C for 7 days (Torres et al. 2010). Infected papaya tissue was then plated on half-strength V8-PARPH selective medium (Ferguson and Jeffers 1999) and incubated at 25°C in the dark. Isolates had white fluffy mycelium on V8 agar. Sporangia averaged 29.68 µm in diameter, 50.59 µm in length, with 4.75 µm long pedicels, which coincide with species description of *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler (Elliot et al. 2004). Identification was confirmed by the sequence of the ITS region

of rDNA (GenBank Accession No. KU170143), using ITS4/ITS6 primer combination which had 100% coverage and identity to *P. palmivora* (GenBank Accession No. KJ755111) through BLASTn analysis. Four isolates were recovered that had identical ITS sequence. Koch's postulates were conducted by inoculating 25 three-month-old palmito seedlings in a screen house, with 0.5 ml of a 30,000-zoospores/ml suspension of an equal mix of two isolates by injection into the apical meristem. An additional 25 seedlings were inoculated with sterile distilled water as controls. Bud rot symptoms were observed 7 days after inoculation on 20 plants. No symptoms appeared on controls which had negative immunostrip tests for *Phytophthora* spp. The pathogen was reisolated from symptomatic plants as described above and identified by microscopy and ITS sequencing, completing Koch's postulates. This is the first report in Ecuador of *P. palmivora* causing bud rot in palmito, and a new host for the pathogen. Diseases on other hosts grown in Ecuador including African oil palm (*Elaeis guineensis*), cacao (*Theobroma cacao*), coffee (*Coffea arabica*), pineapple (*Ananas comosus*), avocado (*Persea americana*), and papaya (*Carica papaya*) are known to be caused by *P. palmivora*. As these crops are often grown in close proximity to palmito, it is important that research on the etiology, epidemiology, and management of this disease be carried out immediately.

References:

- Elliot, M. L., et al. 2004. Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
Ferguson, A. J., and Jeffers, S. N. 1999. *Plant Dis.* 83:1129.
Montúfar, R. and Rosas, J. 2013. Page 77 in: *Palmas Ecuatorianas: biología y uso sostenible*. R. Valencia, et al. Publicaciones del Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
Torres, G. A., et al. 2010. *Plant Dis.* 94:1163.

Proof Only

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Darío Andrés Jácome Romero, CI 1750432500 autor del trabajo de Graduación titulado: “Identificación de Phytophthora palmivora como el agente causal de la pudrición del cogollo en palmito (*Bactris gasipaes*) en el Ecuador”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIA BIOLÓGICAS en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT con formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 9 de mayo de 2016

Darío Andrés Jácome Romero

C.I. 1750432500