



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análisis etiológico de la enfermedad pudrición del cogollo (PC) en cultivo de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en la provincia de Esmeraldas, Ecuador

Vanessa Maribel Abad Valarezo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Análisis etiológico de la enfermedad pudrición del cogollo (PC) en cultivo de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en la provincia de Esmeraldas, Ecuador

Vanessa Maribel Abad Valarezo

2022

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis etiológico de la enfermedad de pudrición del cogollo
(PC) en cultivo de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en
la provincia de Esmeraldas, Ecuador**

Memoria presentada por **Vanessa Maribel Abad Valarezo** para optar al título de
Doctora por la Universidad de Barcelona.

Dra. Magdalena Grifoll

Directora/tutora de la tesis

Universidad de Barcelona

Dr. Francisco Flores Flor

Codirector de la tesis

Universidad de las Fuerzas

Armadas ESPE

Vanessa Maribel Abad Valarezo

Doctoranda

2022

DEDICATORIA

A mi principal motivación y motor de vida, Wil.

AGRADECIMIENTOS

Un especial reconocimiento a mis Directores de tesis, Dra. Magdalena Grifoll y Dr. Francisco Flores, por guiarme durante la realización de esta investigación, además por la paciencia y respaldo brindado en todas las decisiones tomadas.

De la misma manera una profunda gratitud a la M.Sc. Alma Koch, Jefa del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por darme la apertura para desarrollar mi tesis en su laboratorio, además por su constante predisposición para apoyarme durante el desarrollo de mi investigación. En este sentido también agradezco al laboratorio IDgen por facilitarme el uso de sus instalaciones y equipos con el mismo propósito.

Finalmente quiero agradecer a mi querida familia. A mi esposo Wil, mi compañero de vida, por su invaluable apoyo y por motivarme a soñar y ser perseverante en mis objetivos. A mi mamá, Narcisa, por haber inculcado en mí la disciplina y la responsabilidad de un trabajo bien realizado.

RESUMEN

La palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.), a nivel mundial, es uno de los cultivos de aceite más importantes, uno de los de más alto rendimiento, y segundo más consumido. Una de las principales limitantes de la producción de palma es la enfermedad conocida como pudrición de cogollo (PC). En Ecuador se registró por primera vez en 1974, en la ciudad de Santo Domingo, luego de lo cual se extendió hacia las laderas amazónicas, generando un efecto devastador que resultó en la pérdida de un alto porcentaje de las palmas. Los cultivos de palma se localizan principalmente en la región costa, siendo la provincia de Esmeraldas la que concentra el 44.37% (109405 ha) de las 246574 ha plantadas y que presenta un mayor área de cultivos afectada por PC (82948 ha) de acuerdo al último censo palmero en 2017. El Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma), en la búsqueda del agente causal de la PC en Colombia, identificó a *Phytophthora palmivora* en plantaciones de palma al norte de Colombia, sin embargo, en Ecuador no existen estudios que confirmen este hallazgo.

En este trabajo de investigación se identifican los microorganismos potencialmente patógenos presentes en tejidos del primer y segundo estadio de PC de cultivos de palma aceitera del cantón Quinindé de la provincia de Esmeraldas. Para la identificación se emplearon técnicas dependientes de cultivo, barcoding y secuenciación de alto rendimiento (HTS). Se realizaron pruebas de patogenicidad con los microorganismos potencialmente patógenos. Adicionalmente, como posible tratamiento se valoró la actividad antagónica de agentes biológicos y químicos contra los microorganismos potencialmente patógenos. Finalmente se llevaron a cabo cuantificaciones de fenoles totales, como metabolitos implicados en la defensa y se evaluó la capacidad antioxidante de las palmas enfermas y sanas utilizando los métodos DPPH, FRAP y ABTS.

En base a los resultados de HTS se determinó que los hongos más abundantes en plantas del primer estadio fueron *Fusarium* (20.73%) y *Coprinopsis* (16.75%), a diferencia del segundo estadio que fueron *Antrodia* (13.55%), un género no identificado de

Didymellaceae (26.69%) y *Candida* (10.82%), mientras que en plantas sanas fue *Kazachstania* (81.81%). El género bacteriano más abundante en el primer estadio fue una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (17.13%), mientras que en el segundo estadio fueron *Bacteroides* (10.88%) y una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (7.08%). Con las técnicas dependientes de cultivo se obtuvo una mayor predominancia del género *Fusarium* en el primer estadio de la PC.

Las pruebas de patogenicidad confirmaron la capacidad infectiva de las cepas E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) y E1H-15 (*Fusarium solani*) al ser inoculadas en plantas sanas y producir lesiones cloróticas con necrosis similares a la PC. Se evidenció una mayor concentración de fenoles y poder reductor de los radicales FRAP, ABTS y DPPH, en los extractos metanólicos de las hojas de palma del primer estadio de PC y aparentemente sanas. De acuerdo a las pruebas antagónicas, la cepa E2H-3 (*Trichoderma atroviride*) y el fungicida Himexazol presentaron una mayor capacidad de inhibir los patógenos *F. oxysporum* y *F. solani*.

La identificación de los microorganismos asociados a la enfermedad de PC en plantas de palma aceitera permitirá comprender la progresión etiológica de la enfermedad y que sirva como base para la búsqueda de un tratamiento.

Palabras clave: Palma aceitera, pudrición del cogollo, fitopatógenos, secuenciación masiva, antioxidantes.

ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), is one of the most important oil crops, one of the highest-yielding, and second most consumed globally. One of the main limitations of palm production is the disease known as bud rot (PC). In Ecuador, PC was described in 1974, in the city of Santo Domingo, extending to the Amazonian slopes, generating a devastating effect that resulted in the loss of a high percentage of oil palms. Palm crops are located mainly in the coastal region, being the province of Esmeraldas the one that concentrates 44.37% (109405 ha) of the 246574 ha planted in the country and the one that has the highest incidence of PC (82948 ha affected), according to the last palm census in 2017. Cenipalma, in the search for the causal agent of PC in Colombia, identified *Phytophthora palmivora* in palm plantations in northern Colombia, however, in Ecuador there are no studies that confirm this finding.

In this research, the potentially pathogenic microorganisms present tissues of the first and second stage of CP of oil palm crops from the Quinindé canton of the Esmeraldas province were identified. Culture-dependent techniques, barcoding and high-throughput sequencing (HTS) were used for identification. Pathogenicity tests were performed with potentially pathogenic microorganisms. Additionally, as a possible treatment, the antagonistic activity of biological and chemical agents against potentially pathogenic microorganisms was assessed. Finally, quantifications of total phenols were carried out, as metabolites involved in defense, and the antioxidant capacity of diseased and healthy palms was evaluated using the DPPH, FRAP and ABTS methods.

Based on HTS, it was determined that the most abundant fungi in plants of the first stage were *Fusarium* (20.73%) and *Coprinopsis* (16.75%), in the second stage were *Antrodia* (13.55%), an unidentified genus of Didymellaceae (26.69 %) and *Candida* (10.82%), while in healthy plants it was *Kazachstania* (81.81%). The most abundant bacterial genus in the first stage belongs to the Enterobacteriaceae (17.13%), while in the second stage were *Bacteroides* (10.88%) and bacterium of the Enterobacteriaceae

(7.08%). With culture-dependent techniques, the genus *Fusarium* was predominant among isolates obtained from samples in the first stage of CP.

Pathogenicity tests confirmed the infective capacity of the E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) and E1H-15 (*Fusarium solani*) strains when inoculated in healthy plants and producing chlorotic lesions with necrosis similar to PC. A higher concentration of phenols and reducing power of the radicals FRAP, ABTS and DPPH were evidenced in the methanolic extracts of leaves from palms that were asymptomatic or in the first stage of PC. According to the antagonistic tests, a E2H-3 (*Trichoderma atroviride*) strain and the fungicide Himexazol presented greater capacity to inhibit *F. oxysporum* and *F. solani*.

The identification of the microorganisms associated with PC disease in oil palm plants will allow us to understand the etiological progression of the disease and will serve as the basis for the search for a treatment.

Key words: Oil palm, bud rot, plant pathogens, massive sequencing, antioxidants.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Estructura de la tesis.....	4
1.3. Marco teórico.....	5
1.3.1. Palma aceitera (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.).....	5
1.3.1.1. Origen y distribución geográfica.....	5
1.3.1.2. Características del cultivo.....	6
1.3.1.3. Requerimientos edafoclimáticos.....	7
1.3.1.4. Requisitos nutricionales.....	8
1.3.2. Principales enfermedades de la palma de aceite.....	9
1.3.2.1. Anillo rojo.....	9
1.3.2.2. Marchitez letal.....	9
1.3.2.3. Marchitez sorpresiva.....	10
1.3.2.4. Pudrición basal del tallo.....	10
1.3.2.5. Pudrición del cogollo.....	11
1.3.3. Sintomatología de la PC.....	11
1.3.4. Aspectos epidemiológicos de la PC.....	13
1.3.5. Etiología de la PC.....	14
1.3.6. Comunidades microbianas asociadas a la PC.....	14
1.3.6.1. Oomicetos.....	15
1.3.6.2. Hongos.....	16
1.3.6.3. Bacterias.....	17
1.3.7. Tecnologías de secuenciación masiva y bioinformática.....	18

1.3.8. Acción de la planta frente al patógeno	18
1.3.8.1. Fenoles.....	19
1.3.8.2. Carácter antioxidante.....	20
1.3.9. Controles biológicos.....	20
1.3.9.1. Género <i>Trichoderma</i>	21
1.3.9.2. Levaduras	21
1.3.9.3. Género <i>Bacillus</i>	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo general.....	24
2.2. Objetivos específicos	24
2.3. Posibles contribuciones de la tesis.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Muestreo	27
3.2. Procesamiento de muestras	29
3.3. Extracción de ADN total del cogollo.....	29
3.4. Amplificación del ADN total mediante PCR	30
3.5. Identificación molecular mediante secuenciación masiva y análisis bioinformático.....	32
3.6. Diseño de estrategias de aislamiento dirigido.....	33
3.6.1. Aislamiento de bacterias.....	33
3.6.2. Aislamiento de hongos y oomicetos.....	33
3.7. Identificación de microorganismos.....	34
3.7.1. Identificación de bacterias	34
3.7.2. Identificación de hongos y oomicetos	34
3.8. Identificación molecular de aislados.....	35
3.8.1. Extracción de ADN de aislados.....	35
3.8.2. Amplificación de ADN de aislados mediante PCR.....	35
3.8.3. Secuenciación Sanger y alineamiento en bases de datos.....	36
3.8.4. Análisis filogenético.....	36

3.9. Pruebas de patogenicidad.....	37
3.9.1. Evaluación de síntomas	39
3.9.2. Reaislamiento de patógenos a partir de plantas sintomáticas.....	39
3.10. Evaluación de la actividad antagónica.....	40
3.11. Determinación de fenoles totales	41
3.12. Evaluación del carácter antioxidante	41
3.12.1. Por el método FRAP.....	41
3.12.2. Por el método DPPH	41
3.12.3. Por el método ABTS	42
4. RESULTADOS	44
4.1 Puesta a punto de un protocolo de extracción de ADN total de muestras de palma.....	44
4.2. Calidad de los resultados de secuenciación para ITS y 16S ARNr	48
4.3. Análisis taxonómico de la comunidad fúngica	50
4.3.1. Análisis de biodiversidad alfa.....	54
4.3.2. Análisis de biodiversidad beta.....	57
4.4. Análisis taxonómico de la comunidad bacteriana.....	62
4.4.1. Análisis de biodiversidad alfa.....	67
4.4.2. Análisis de biodiversidad beta.....	70
4.5. Aislamiento e identificación de cepas fúngicas asociadas a la PC	75
4.6. Análisis filogenético de los aislados fúngicos	81
4.7. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas asociadas a la PC.....	83
4.8. Evaluación de la patogenicidad de aislados.....	84
4.9. Pruebas de antagonismo con controles biológicos y químicos.....	92
4.10. Cuantificación de fenoles totales	97
4.11. Capacidad antioxidante.....	99
4.11.1. Método FRAP.....	99
4.11.2. Método DPPH	102
4.11.3. Método ABTS	103

5. DISCUSIÓN	106
5.1. Perfil taxonómico fúngico mediante NGS.....	106
5.2. Perfil taxonómico bacteriano mediante NGS	109
5.3. Frecuencia de aislamiento de la comunidad fúngica mediante técnicas dependientes de cultivo.....	111
5.4. Frecuencia de aislamiento de la comunidad bacteriana mediante técnicas dependientes de cultivo.....	112
5.5. Pruebas de patogenicidad.....	113
5.6. Evaluación de antagonismo	115
5.7. Concentración de fenoles y capacidad antioxidante	117
6. CONCLUSIONES	121
6.1. Recomendaciones futuras	124
7. BIBLIOGRAFÍA	126

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Condiciones edafoclimáticas par el cultivo de palma aceitera	8
Tabla 2.	Microorganismos frecuentes aislados de tejidos procedentes de palmas afectadas con PC	14
Tabla 3.	Muestras de cogollo y hojas recolectadas en cinco puntos del cantón Quinindé de la provincia de Esmeraldas.	27
Tabla 4.	Protocolos de extracción de ADN total de muestras de cogollo de plama aceitera.	30
Tabla 5.	Primers usados para amplificación de los genes 16S ARNr, ITS y CoxII.	31
Tabla 6.	Programación del termociclador para la amplificación por PCR.	31
Tabla 7.	Detalle de componentes utilizados para la amplificación por PCR.....	31
Tabla 8.	Grado de síntomas externos de pudrición de cogollo en palma aceitera.....	39
Tabla 9.	ADN total extraído en cada tratamiento y cuantificado en Nanodrop.	45
Tabla 10.	Análisis de la varianza para la variable concentración de ADN en InfoStat....	46
Tabla 11.	Prueba Tukey para la variable concentración de ADN en InfoStat.....	46
Tabla 12.	Número de secuencias en cada paso del pipeline del plugin DADA2 de QIIME 2 para el gen ITS.	49
Tabla 13.	Número de secuencias en cada paso del pipeline del plugin DADA2 de QIIME 2 para el gen 16S ARNr.	49
Tabla 14.	Diversidad de especies fúngicas en las muestras analizadas por NGS.....	56
Tabla 15.	Prueba de permutación de dispersiones multivariadas para hongos.....	61
Tabla 16.	Diversidad de especies bacterianas en las muestras analizadas por NGS.	69
Tabla 17.	Prueba de permutación de dispersiones multivariadas para bacterias.....	74
Tabla 18.	Cepas fúngicas identificadas a nivel de género en base a sus características macroscópicas y microscópicas.	76

Tabla 19. Aislados fúngicos del cogollo de palma aceitera en primer estadio de PC identificados mediante secuenciación Sanger del gen ITS.	77
Tabla 20. Aislados fúngicos del cogollo de palma aceitera en segundo estadio de PC identificados mediante secuenciación Sanger del gen ITS.	78
Tabla 21. Modelos de sustitución de nucleótidos estimados en MEGA X para el gen ITS de aislados fúngicos	81
Tabla 22. Pruebas de identificación evaluadas en aislados bacterianos.	83
Tabla 23. Identificación molecular de los aislados bacterianos mediante secuenciación Sanger.	84
Tabla 24. Pruebas de patogenicidad	85
Tabla 25. Análisis de la varianza para la variable sintomatología en InfoStat.	86
Tabla 26. Prueba Tukey para la variable tipo de microorganismo en InfoStat.	86
Tabla 27. Prueba Tukey para la variable método de inoculación en InfoStat.	87
Tabla 28. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de cepas fúngicas en el séptimo día del bioensayo dual.	93
Tabla 29. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-35 (<i>Fusarium oxysporum</i>) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.	94
Tabla 30. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-35 (<i>Fusarium oxysporum</i>) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.	94
Tabla 31. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-15 (<i>Fusarium solani</i>) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.	94
Tabla 32. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-15 (<i>Fusarium solani</i>) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.	95
Tabla 33. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-39 (<i>Fusarium ambrosium</i>) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.	95

Tabla 34. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-39 (<i>Fusarium ambrosium</i>) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.	95
Tabla 35. Valores obtenidos en la determinación de fenoles totales	97
Tabla 36. Análisis de la varianza para la variable concentración de fenoles totales en InfoStat.	98
Tabla 37. Prueba Tukey para la variable concentración de fenoles totales en InfoStat....	98
Tabla 38. Evaluación de la capacidad oxidante de los extractos de palma aceitera mediante los métodos FRAP, ABTS y DPPH.	100
Tabla 39. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método FRAP en InfoStat.	100
Tabla 40. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método FRAP en InfoStat.....	101
Tabla 41. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método DPPH en InfoStat.....	102
Tabla 42. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método DPPH en InfoStat.	102
Tabla 43. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método ABTS en InfoStat.....	103
Tabla 44. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método ABTS en InfoStat.	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expansión del cultivo de palma aceitera	6
Figura 2. Lesiones tempranas de PC	12
Figura 3. Cultivos de palma aceitera: A) Sana, B) Primer estadio de la PC, C) Parte interna del cogollo en primer estadio de la PC.....	28
Figura 4. Cultivos de palma aceitera en varios estadios de la PC: A) Segundo estadio de la PC, B) Flecha en segundo estadio de PC, C) Tercer estadio de la PC.....	28
Figura 5. Plantas de palma aceitera de seis meses de edad de la variedad Tenera INIAP.....	38
Figura 6. Pruebas de patogenicidad.	38
Figura 7. Concentración de ADN total en cada tratamiento.	46
Figura 8. Electroforesis para visualizar integridad del ADN total de cogollo.	47
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para amplicones ADN total.	48
Figura 10. Composición de las comunidades fúngicas en muestras de cogollo a nivel de filo.	50
Figura 11. Composición de las comunidades fúngicas en muestras de cogollo a nivel de familia.	51
Figura 12. Composición de las comunidades fúngicas en muestras de cogollo a nivel de género.....	52
Figura 13. Mapa de calor de la abundancia relativa de secuencias de hongos a nivel de género.....	53
Figura 14. Conteos normalizados entre plantas sanas y enfermas para las ASV con abundancias diferenciales.	54
Figura 15. Índices de biodiversidad fúngica analizada en muestras de cogollo en cada estadio de PC.	55
Figura 16. Árbol de calor diferencial que representa el cambio en la abundancia de taxones fúngicos entre plantas sanas y enfermas.	57
Figura 17. PCoA calculado utilizando medidas de Bray-Curtis para el gen ITS.....	58

Figura 18. PCoA calculado utilizando medidas de Jaccard para el gen ITS.....	59
Figura 19. PCoA calculado utilizando medidas de Unweighted Unifrac para el gen ITS.....	60
Figura 20. PCoA calculado utilizando medidas de Weighted Unifrac para el gen ITS.....	61
Figura 21. Composición de las comunidades bacterianas en muestras de cogollo a nivel de filo.....	63
Figura 22. Composición de las comunidades bacterianas en muestras de cogollo a nivel de familia.....	64
Figura 23. Composición de las comunidades bacterianas en muestras de cogollo a nivel de género.....	65
Figura 24. Mapa de calor de la abundancia relativa de secuencias de bacterias a nivel de género.....	66
Figura 25. Conteos normalizados entre plantas sanas y enfermas para las ASV bacterianas más abundantes.....	67
Figura 26. Índices de biodiversidad bacteriana analizados en las muestras de cogollo en cada estadio de PC.....	68
Figura 27. Árbol de calor diferencial que representa el cambio en la abundancia de taxones bacterianos entre plantas sanas y enfermas.....	70
Figura 28. PCoA calculado utilizando medidas de Bray-Curtis para el gen 16S ARNr.....	71
Figura 29. PCoA calculado utilizando medidas de Jaccard para el gen 16S ARNr.....	72
Figura 30. PCoA calculado utilizando medidas de Unweighted Unifrac para el gen 16S ARNr.....	73
Figura 31. PCoA calculado utilizando medidas de Weighted Unifrac para el gen 16S ARNr.....	74
Figura 32. Hongos aislados del cogollo.....	75
Figura 33. Electroforesis de los productos PCR de los aislados (gen ITS).....	77
Figura 34. Fotografías del anverso y reverso de los cultivos de los hongos aislados.....	78
Figura 35. Tinción de esporas de los aislados fúngicos.....	80

Figura 36. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de secuencias de la región ITS de hongos aislados (cuadro rojo) del cogollo de la palma aceitera.	82
Figura 37. Prueba de pudrición de papa a las 72 horas	84
Figura 38. Evolución de síntomas del día 40 (izquierda) al día 50 (derecha) en el tratamiento A5 con la cepa E1H-39 (<i>Fusarium ambrosium</i>).	85
Figura 39. Capacidad infectiva de las diferentes cepas de acuerdo a la cuantificación de síntomas en cada método de inoculación.	87
Figura 40. Evaluación de síntomas externos con la cepa E1H-35 (<i>Fusarium oxysporum</i>).	88
Figura 41. Evaluación de síntomas externos con la cepa E1H-15 (<i>Fusarium solani</i>).....	89
Figura 42. Evaluación de síntomas externos con la cepa E1H-39 (<i>Fusarium ambrosium</i>).....	90
Figura 43. Cepa E1H-35 (<i>Fusarium oxysporum</i>) reaislada en medio PDA.....	91
Figura 44. Cepa E1H-15 (<i>Fusarium solani</i>) reaislada en medio PDA	91
Figura 45. Pruebas de antagonismo cepa E1H-35 (<i>Fusarium oxysporum</i>) en medio PDA.	96
Figura 46. Pruebas de antagonismo de cepa E1H-15 (<i>Fusarium solani</i>) en medio PDA... ..	96
Figura 47. Pruebas de antagonismo de cepa E1H-39 (<i>Fusarium ambrosium</i>) en medio PDA.	97
Figura 48. Concentración de fenoles totales.	99
Figura 49. Evaluación de la actividad oxidante por el método FRAP.	101
Figura 50. Evaluación de la actividad oxidante por el método DPPH.....	103
Figura 51. Evaluación de la actividad oxidante por el método ABTS.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Agar agua al 2%
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AN	Agar nutriente
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ASV	Variantes de secuencia de amplicones
BLAST	Acrónimo del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , herramienta básica de búsqueda de alineación local
CMA	Agar harina de maíz modificado
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DADA	Acrónimo del inglés <i>Divisive Amplicon Denoising Algorithm</i>
DCA	Diseño completamente al azar
DBC	Diseño de bloques completamente al azar
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FRAP	Poder de reducción antioxidante del ión férrico
GAE	Equivalente de ácido gálico
ha	Hectárea
HTS	Secuenciación masiva o de alto rendimiento
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
ITS	Espaciador interno transcrito
Kb	Kilobase o kbp (mil pb)
Medio PARPV₈	Medio con pimaricina, ampicilina, rifamicina, PCNB, V8 juice
Medio P₁₀VP	Medio con pimaricina, vancomicina y PCNB
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Concentración milimolar
μM	Concentración micromolar

NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NGS	Secuenciación de nueva generación
OTU	Unidad taxonómica operativa
Pb	Pares de bases
PC	Pudrición del cogollo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCNB	Pentacloronitrobenceno
PCoA	Acrónimo del inglés <i>Principal Coordinates Analysis</i> , análisis de coordenadas principales
PDA	Papa dextrosa agar
PERMANOVA	Acrónimo del inglés <i>Permutational multivariate analysis of variance</i> , análisis de varianza multivariante permutacional
pH	Potencial hidrógeno
PIB	Producto interno bruto
PIC	Porcentaje de inhibición de crecimiento radial
QIIME	Acrónimo del inglés <i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SIM	Acrónimo del inglés <i>Sulfide Indole Motility</i> , medio de sulfuro indol para movilidad
SNA	Acrónimo del alemán <i>Spezieller Nährstoffarmer Agar</i> , agar bajo en nutrientes
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
YPD	Extracto de levadura peptona dextrosa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una planta de gran interés comercial en Latinoamérica, donde Colombia dominó el mercado con una producción de 8390314 toneladas en 2019 y en cuarto lugar Ecuador con 2275948 toneladas. En los últimos años la producción de aceite de palma ha aumentado significativamente, constituyendo el aceite de mayor consumo a nivel mundial [1].

Las principales enfermedades en las plantaciones de palma aceitera en América del Sur y Central son la pudrición del cogollo (PC), la marchitez letal, pudrición de las raíces y de la base del tronco, pudrición basal del tronco, pudrición de los racimos, mal de hilachas y el anillo rojo. Estas enfermedades generan una gran pérdida en el sector palmicultor, limitando la producción y desarrollo del mismo. La PC es actualmente la mayor amenaza para la palma aceitera en países como Ecuador, Colombia, Brasil, Panamá y Surinam, donde afecta gravemente el rendimiento y supervivencia de las plantas [2][3][4][5].

Conforme a Turner [6] se han requerido pocos años para que plantaciones completas de palma hayan sido destruidas por la PC, situación que ya ha tenido lugar en las zonas productoras de Ecuador. Los primeros registros de daños de la PC a gran escala se presentaron en plantaciones de palma aceitera al norte de Colombia durante los años sesenta [7]. En Ecuador esta enfermedad se registró por primera vez en 1974 en la ciudad de Santo Domingo y su efecto fue catastrófico al extenderse la enfermedad hacia las laderas amazónicas [4][8][9].

Según el Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos (INEC), en 2019 la superficie de palma aceitera plantada en Ecuador fue de 246574 hectáreas, constituyendo el 15.98% de toda la superficie plantada con cultivos permanentes mientras que la

superficie cosechada a nivel nacional fue de 200908 ha, un 10.3% menos con respecto al año 2018 (223962 ha) [10]. Los cultivos de palma se localizan principalmente en la región costa, cuya provincia de Esmeraldas concentra el 44.37% (109405 ha) de la superficie total plantada en el país, seguida por Los Ríos (16.66%), Santo Domingo de los Tsáchilas (8.15%) y Manabí (7.02%) [10][11].

De acuerdo al último censo palmero de 2017, el 57% de las plantaciones de palma han sido afectadas por PC, donde la provincia de Esmeraldas presentó una mayor área de cultivos afectados por PC (82948 ha) en comparación con otras provincias como Sucumbíos (17830 ha), Pichincha (13475 ha), Santo Domingo de los Tsáchilas (10782 ha) y Orellana (9897 ha). En Esmeraldas la enfermedad se ha encontrado en siete cantones, mayormente en el cantón Quinindé con un 90% de áreas afectadas por PC [12][13][14]. En Santo Domingo de los Tsáchilas se han perdido un total de 45 ha de palma por PC, problema que fue declarado como emergencia Nacional durante el 2014 con expectativa de recuperación para el año 2025 [15][14].

La palma aceitera representa un importante rubro social y económico para el sector agropecuario del Ecuador, por ser materia prima de aceites y grasas comestibles. Durante el periodo 2010 a 2016 la palma constituyó el séptimo producto agrícola de exportación del país con un crecimiento del 8% en promedio anual. El 42% del aceite de palma producido en Ecuador se destinaba al consumo interno, mientras que el 58% se exportaba como aceite crudo de palma y como productos elaborados, generando US\$ 271 millones en divisas de exportación y empleo a unas 100000 personas en el país [16]. Su peso específico en el Producto Interno Bruto (PIB) sectorial es de 7% y en el total 0.59% [17].

En Colombia y Ecuador se han probado varios métodos de control contra la enfermedad de PC como: realizar cortes del tejido afectado en estadios tempranos de la enfermedad [18], siembra de híbridos interespecíficos (*E. oleífera* x *E. guineensis*) [19][20], controles químicos [18], etc. No obstante, estas alternativas no han establecido una solución para erradicar la enfermedad. Además, la aplicación de ciertos productos

químicos de uso común en los cultivos, como los herbicidas a base de glifosato, pueden aumentar la susceptibilidad de los cultivos a enfermedades [21].

Existen diversas hipótesis sobre la causa de la PC, mismas que contemplan aspectos nutricionales y fisiológicos de la planta, composición química del suelo [22] e infección por agentes fitopatógenos como hongos [2][23][24][25][26][27][28], bacterias [4], virus [29], insectos [30] y nemátodos [31]. Sin embargo, estas hipótesis no han sido comprobadas en su totalidad.

El Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma) de Colombia, en la búsqueda del agente causal de la PC, examinó los primeros estadios de la enfermedad y mediante la técnica de trampeo [32] identificó a *Phytophthora palmivora* [2][24] como el agente causal. Cenipalma observó hifas del hongo en el avance de las lesiones necróticas en el cogollo, con esporangios en las regiones húmedas y clamidosporas en las áreas necróticas. Sin embargo, en Ecuador no se ha podido identificar a este oomicete en palmas con síntomas de PC.

Según INIAP, en Ecuador las primeras investigaciones se llevaron a cabo en la Estación Experimental Santo Domingo INIAP, revelando la presencia de colonias de *Fusarium solani*, *F. roseum*, *Sporotrichum* sp., *Thielaviopsis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., en muestras de cogollo y raíces, pero no hubo evidencia de que sean responsables de la PC, debido a que no pudieron reproducir la enfermedad en plantas sanas [8][23].

Ronquillo [33], en su afán de determinar los microorganismos asociados a la PC en plantaciones de palma en San Lorenzo y Quinindé, utilizó tiras serológicas para detectar la presencia de *P. palmivora* en hojas, cogollo y raíces. No obstante, no demostró que *P. palmivora* sea el agente causal debido a la ausencia del oomiceto en todas las muestras sintomáticas, a excepción de 2 muestras de raíces de plantas asintomáticas que fueron positivas para el oomiceto.

Resulta necesario identificar la comunidad microbiana asociada a la PC de plantas de palma aceitera mediante técnicas dependientes de cultivo y por tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, así como evaluar la concentración de los compuestos químicos que produce la planta frente al ataque de patógenos como fenoles y la determinación de carácter antioxidante como medio común de defensa. Esta información ampliará el conocimiento sobre la etiología de la enfermedad y permitirá, en futuras investigaciones, el desarrollo de tratamientos efectivos y específicos contra los microorganismos identificados como patógenos causales de la PC.

1.2. Estructura de la tesis

Este trabajo de investigación se organizó en las siguientes secciones:

La primera sección es una introducción de los antecedentes y consideraciones teóricas sobre la enfermedad de PC en palma aceitera.

En la segunda sección se detalla la finalidad de esta investigación que consistió en analizar la etiología de la PC proponiendo enfoques microbiológicos y moleculares para caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas presentes en palmas sanas y enfermas con PC. Además se exponen las principales contribuciones obtenidas en el desarrollo de este trabajo.

La tercera sección describe los métodos propuestos para analizar la causa de la PC que incluyen la estandarización de un protocolo de extracción de ADN total del cogollo de buena calidad para la identificación de comunidades fúngicas y bacterianas mediante el empleo de técnicas dependientes de cultivo, barcoding y secuenciación de alto rendimiento. También se explican los procedimientos bioinformáticos empleados, así como las pruebas de patogenicidad elaboradas con los patógenos que cumplieron con los postulados de Koch y pruebas de antagonismo como posibles tratamientos biológicos contra la PC. Además, se incluye un análisis de concentración de fenoles y capacidad antioxidante que servirá como base de futuros estudios de otros tratamientos de la enfermedad.

En la cuarta sección se presentan los resultados, que incluyen un protocolo de extracción de ADN total óptimo para trabajar con muestras de cogollo de palma, los análisis metataxonómicos y la eficacia de los antagonistas evaluados con los patógenos identificados.

En la quinta sección se aborda la discusión de los resultados. Se comparan las comunidades fúngicas y bacterianas en cada estadio de la PC y respecto a plantas sanas, y se discuten los resultados de la caracterización microbiana con resultados de otras investigaciones.

Finalmente, las conclusiones y perspectivas futuras se presentan en la sexta sección.

1.3. Marco teórico

1.3.1. Palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.)

1.3.1.1. Origen y distribución geográfica

La palma de aceite (*E. guineensis*) es un cultivo perenne originario del continente africano de acuerdo a estudios palinológicos y de diversidad genética en material de palma aceitera de 11 países de África [34][35][36], nombrado por Jacquin en 1763 basándose en la palabra griega *elaion*, que significa aceite, y *guineensis*, que hace referencia a su región de origen.

La expansión del cultivo en América se dio en el siglo XVI a lo largo de la costa de la región de la antigua capital de Brasil, San Salvador. Desde entonces es cultivado en tres áreas principales de los trópicos ecuatoriales: África, Sudeste de Asia y América del Sur y Central (Figura 1) [1][37].

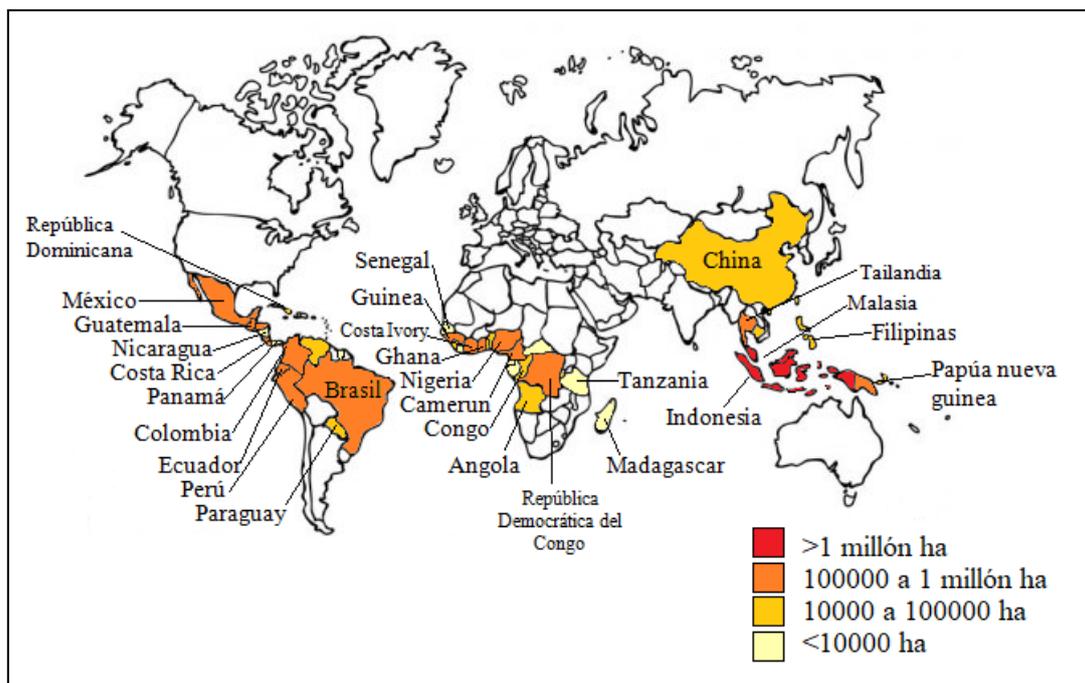


Figura 1. Expansión del cultivo de palma aceitera: Países productores de aceite de palma en 2020 [1].

La segunda especie, *E. oleífera*, se originó en América del Sur o Central y ha sido llevada a otros continentes con fines de reproducción e investigación, pudiéndose formar híbridos (en ocasiones fértiles) entre las especies *E. guineensis* y *E. oleífera* [38].

En Ecuador a principios de 1960, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) estableció una estación experimental de palma aceitera en el cantón La Concordia, cerca de la primera plantación de palma plantada en 1953 con semilla Dura x Deli de polinización abierta y origen hondureño (mezcla de genotipos africanos y asiáticos) [38][39][40].

1.3.1.2. Características del cultivo

Pertenece a la familia *Arecaceae* dentro del reino vegetal que presenta la mayor eficiencia en producción de aceite por unidad de superficie en comparación a otros cultivos. El aceite está compuesto por ácidos grasos saturados palmítico (39.3–47.5%) y esteárico (3.5–6%) así como por ácidos grasos insaturados como el oleico (36–44%) y el linoleico (9-12%). Además el aceite de palma está constituido por una gran cantidad

de antioxidantes como carotenos (62% de β -caroteno y 38% de α -caroteno), vitamina E (>80% de tocotrienoles y <20% de tocoferoles), presentando cualidades benéficas para la salud y formando parte fundamental de la dieta ecuatoriana [41].

La palma tiene hojas pinnadas con un tallo columnar con entrenudos cortos, presenta espinas cortas en el pecíolo de la hoja y dentro del racimo de fruta. Normalmente es monoica con inflorescencias masculinas o femeninas, a veces mixtas, que se desarrollan en las axilas de las hojas. Los frutos nacen en racimos grandes y compactos. La pulpa de la fruta, que proporciona el aceite de palma, está rodeada por una nuez [38].

La planta crece aproximadamente de 25 a 45 cm por año en su tronco, iniciando su fase productiva a los 3 años de edad y viviendo hasta 50 años [34]. En el caso de producción con fines comerciales, el promedio de vida útil de la palma está entre 24 y 28 años. Durante este periodo la palma puede alcanzar una producción por hectárea de racimos con un peso aproximado de 600 toneladas bajo condiciones óptimas del suelo [42].

1.3.1.3. Requerimientos edafoclimáticos

Las escasas precipitaciones y la altitud son las mayores barreras para el establecimiento y crecimiento de la palma aceitera, dificultando su crecimiento por encima de los 300 m.s.n.m. En Camerún con suficientes precipitaciones puede crecer hasta 1300 m.s.n.m en la montaña y hasta 1000 m.s.n.m en Guinea, Camerún y África Oriental, aunque los rendimientos tienden a ser bajos [38]. Las condiciones edafoclimáticas adecuadas para el desarrollo y producción de palma aceitera se exponen en la Tabla 1.

Cuando los suelos presentan una alta acidez, la palma aceitera es susceptible a períodos prolongados de déficit hídrico debido a que se limita la profundización de las raíces, resultando óptimos los suelos profundos de textura franco arcillosa (adecuada porosidad) con suficiente capacidad de saturación de humedad, buen drenaje y contenido de materia orgánica. Las temperaturas inferiores a 17°C durante varios días provocan una reducción del desarrollo de plantas adultas y en vivero detienen el crecimiento de las plántulas. Además, la palma aceitera se identifica como planta

heliófila por sus altas necesidades de luz, requiriendo aproximadamente 1500 horas de luz al año para lograr altas producciones [43].

Tabla 1. Condiciones edafoclimáticas par el cultivo de palma aceitera [43][44].

Condiciones edafoclimáticas	Requerimientos
Topografía	Terrenos planos, con pendientes suaves o ligeramente ondulados (pendientes inferiores al 2%)
Profundidad	0.60 m
Textura del suelo	Franco, limoso, franco arcilloso (<35% de arcilla), franco arcillo limoso, franco arcillo arenoso, arcillo arenoso, arcillo limoso.
Pedregosidad	Sin o con pocas piedras.
pH	5.6 - 6.5 (moderadamente ácido) a 6.5 - 7.5 (neutro).
Salinidad	< 2 dS/m.
Nivel de fertilidad	Media a alta (determinada según análisis de suelos).
Drenaje	Bueno a moderado
Altitud	0 a 500 msnm
Precipitación	De 1500 a 1800 mm/año, entre 120 a 150 mm/mes
Temperatura	24 a 26°C media anual
Humedad relativa	>75% media mensual

1.3.1.4. Requisitos nutricionales

La demanda de nutrientes de la palma aceitera se basa en el tipo de suelo, clima, material genético, manejo del cultivo, etc. Generalmente la planta realiza un reciclaje parcial de los principales elementos nutritivos al extraer nutrientes del suelo que han sido adicionados al suelo mediante hojas senescentes, inflorescencias, renovación del sistema radical, racimos vacíos y desechos orgánicos producto de la extracción del aceite de palma. Otra parte de los elementos nutritivos se pueden restituir mediante la aplicación de fertilizantes que enriquezcan el suelo con los elementos que se han perdido. Existen 16 elementos considerados necesarios para el desarrollo de las plantas, entre los más importantes está el nitrógeno, fosforo, potasio, magnesio, azufre y boro, mismos que en su mayoría provienen del suelo [45].

1.3.2. Principales enfermedades de la palma de aceite

América del Sur y Central se consideraban áreas privilegiadas para la expansión de la palma aceitera, sin embargo, varias enfermedades que no se encuentran en otras partes del mundo han llegado a ser perjudiciales en esas zonas. La palma aceitera presenta requerimientos ecológicos especiales cuya desatención resulta en disturbios fisiológicos o condiciones favorables para el desarrollo de plagas y enfermedades. Las principales enfermedades en las plantaciones de palma en Centro y Sur América son la PC, la marchitez letal, pudrición de las raíces y de la base del tronco, pudrición basal del tronco, pudrición de los racimos, mal de hilachas y el anillo rojo, estas enfermedades generan una gran pérdida en el sector palmicultor, limitando la producción y desarrollo del mismo [3][38]. En algunos países se han trabajado con los híbridos de *E. oleífera* × *E. guineensis*, por su resistencia a las enfermedades [38].

1.3.2.1. Anillo rojo

Enfermedad frecuente en América del Sur caracterizada por presentar un anillo marrón de 1 a 2 cm de ancho en la zona interna del tronco junto con otros síntomas como clorosis de hojas que evolucionan a manchas color marrón, enrollamiento de las hojas del cogollo y marchitez con podredumbre. El agente causal de la enfermedad es el nematodo *Bursaphelenchus cocophilus*, transmitido por el coleóptero *Rhynchophorus palmarum* [46].

1.3.2.2 Marchitez letal

Se caracteriza por presentar hojas amarillas, quemadas y secas sin un orden definido en la planta. El secado y necrosado de hojas comienza desde las puntas hasta llegar a la base. Asimismo, las raíces pueden podrirse o mostrar una tonalidad rojiza. De acuerdo a investigaciones, se presume que la enfermedad está asociada a la presencia de un fitoplasma cuyo vector sería el insecto *Myndus crudus*, pudiendo afectar frecuentemente a plantas de 15 a 18 años [46].

1.3.2.3. Marchitez sorpresiva

A diferencia de la Marchitez Letal esta enfermedad afecta mayormente a plantas jóvenes desde 1 año de edad, caracterizándose por presentar una pudrición repentina de los racimos en desarrollo con marchitamiento progresivo de las hojas del nivel inferior de la planta y clorosis en las hojas del nivel medio con coloraciones marrón rojiza en las puntas de los folíolos. La podredumbre comienza en las extremidades y avanza hacia el tronco y las raíces inferiores, las cuales presentan una pigmentación rojiza alrededor del cilindro central hasta finalmente secarse [46].

Se ha asociado a *Phytomonas staheli*, un protozoo flagelado, como el agente causal de esta enfermedad, encontrándolo tanto en el floema de raíces como en tejidos meristemáticos, base de lanza y tallos de inflorescencia. Por ello, algunas investigaciones [47] han identificado al insecto *Lincus lethifer*, que vive en las axilas de las hojas, como el vector responsable de la transmisión del protozoo [46].

1.3.2.4. Pudrición basal del tallo

Se ha identificado a *Ganoderma* como el agente causal, el cual es un hongo que crece como parásito facultativo de plantas, aunque pueden vivir como saprófitos en tocones y raíces en descomposición. Está ampliamente distribuido en zonas templadas, regiones subtropicales y tropicales y parecen desarrollarse mejor en condiciones de calor y humedad. Algunas especies son patógenas causando la pudrición de raíz y tallo en una variedad de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, provocando la muerte de las plantas afectadas [48].

Las esporas del hongo infectan las heridas abiertas de raíces y áreas inferiores de la planta cuyos síntomas pueden tardar varios años en desarrollarse. La presencia del patógeno a menudo es visible cuando el hongo ha descompuesto más de la mitad del tejido de la parte que funciona como ancla [48].

1.3.2.5. Pudrición del cogollo

A inicios de 1980 había grandes expectativas para el desarrollo de la palma aceitera en el Oriente ecuatoriano, pero más tarde, el brote de PC y la enfermedad del amarillamiento fatal impidieron una mayor expansión, y el área plantada se ha mantenido en 246574 hectáreas en 2019 [1][38].

Los síntomas típicos de esta enfermedad incluyen clorosis de hojas y daño en el cogollo, órgano de la planta donde ocurre la formación de nuevos tejidos, el mismo que se ubica a la altura de los racimos y por encima del punto de crecimiento de la palma aceitera, encontrándose tejidos jóvenes sensibles a la PC [49].

La PC es el resultado de la interacción de agentes bióticos y abióticos, existiendo en regiones donde existe una elevada humedad relativa y temperaturas entre 25 a 30°C [15][4]. Los primeros informes del brote de la enfermedad se reportaron en Surinam, donde plantaciones de 4 años se destruyeron por completo en 1920 [50][51].

Los síntomas de la PC difieren considerablemente entre las diferentes áreas de cultivo, relacionando su severidad con las condiciones edafoclimáticas, con la virulencia de los biotipos causantes de la enfermedad y con la condición genética y fisiológica de las palmas. Durante el desarrollo de la PC, la palma continuamente está intentando producir nuevas hojas para superar el problema, no obstante, en todas las nuevas emisiones hay reincidencia de la enfermedad. Esos intentos de recuperación son más frecuentes en zonas con baja humedad relativa y periodos secos prolongados [49].

1.3.3. Sintomatología de la PC

La sintomatología de la PC ha sido descrita por varios autores, generalmente en sus zonas respectivas de intervención [52], con aspectos similares a la anomalía que devastó las plantaciones de Turbo en Colombia, Panamá, Nicaragua y Costa Rica [23]. Los síntomas son variables y dependen de las condiciones ambientales, material de siembra y del manejo del cultivo [20].

Los primeros síntomas de la PC en la palma comienzan con una clorosis en las hojas más jóvenes con pérdida total o parcial de las hojas de lanza. La reducción significativa de las hojas conlleva a una reducción de la actividad fotosintética, una baja actividad bioquímica y procesos metabólicos alterados que a la vez afectan la fructificación de la palma [53].

La enfermedad progresa al formarse una lesión necrótica en la base de la flecha, aumentando en tamaño y número hasta secarse el foliolo (Figura 2). Posteriormente los daños avanzan hasta los tejidos meristemáticos inhibiendo el desarrollo de hojas junto con estructuras reproductivas y promoviendo su licuefacción con la posterior muerte de la planta [20][15][54].

Además, la PC generalmente se manifiesta con el doblamiento a nivel del tercio inferior de la flecha seguido de una necrosis que se extiende por contacto de un foliolo a otro, ocasionando la pérdida de todas las flechas. En algunos casos la pudrición interna, de color salmón y olor desagradable, no alcanza a afectar el meristemo apical permitiendo la emisión de nuevas hojas pequeñas y deformes [4][55][6][56].

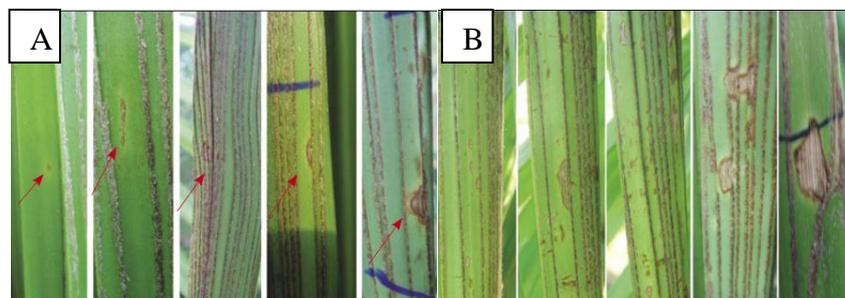


Figura 2. Lesiones tempranas de PC. A) Primeras lesiones en la flecha. B) Aumento en número y tamaño de lesiones [49].

En otros casos la enfermedad avanza por la parte central de hojas no diferenciadas hasta afectar la zona meristemática, impidiendo el crecimiento de nuevas hojas. Cuando hay recuperación de las plantas se observa inicialmente la emisión de hojas y foliolos cortos. La PC lleva al colapso de las hojas nuevas, el cual es un síntoma característico de la enfermedad [49][57].

En Ecuador se ha observado tres tipos de síntomas de PC en las palmas aceiteras de acuerdo a la región donde se desarrollan. En la región costa (zonas de las laderas del Pacífico), la pudrición se propaga lentamente y rara vez es letal. En región oriente (zonas de las laderas del Amazonas), la podredumbre se propaga rápidamente al meristemo, rodeando e invadiendo todos los tejidos jóvenes. Finalmente una tercera sintomatología se ha presentado en la Amazonía ecuatoriana, con podredumbre que se propaga más lento al meristemo junto con un acortamiento de las hojas jóvenes [4].

Es importante mencionar que aunque exista la probabilidad de recuperación natural de la palma, se deben seguir estrategias de manejo de las palmas cuando se encuentran enfermas para no extender el período improductivo y fortalecer los focos de la enfermedad [58][59].

1.3.4. Aspectos epidemiológicos de la PC

Uno de los aspectos más críticos de la palmicultura está relacionado con los problemas fitosanitarios del cultivo, cuyo análisis epidemiológico presenta dos fases: en la fase 1, de establecimiento, las palmas se infectan al azar, ocasionando pérdidas que se mantienen por debajo del 1% al año. En contraste, la segunda fase se caracteriza por la propagación focal de la enfermedad a partir de las palmas dispersas infectadas en la primera fase, mediante la transmisión por el viento o por vectores desplazados por el viento [60].

En trabajos se ha observado que la eliminación de palmas infectadas durante la fase 1 de desarrollo de la enfermedad, a través de rondas fitosanitarias realizadas cerca de seis veces al año, posibilita que la enfermedad permanezca en la fase 1 y cause un bajo impacto económico [50][61].

En la búsqueda de mejores manejos agronómicos, Cenipalma ha generado un paquete tecnológico que le permite a la planta comportarse mejor ante un ataque de PC, de acuerdo a lo observado en la zona oriental de Colombia, donde aceleraron los procesos de recuperación de la palma [59].

Además, los compuestos químicos pueden ayudar a controlar la enfermedad, como los compuestos férricos que afectan las poblaciones y patogenicidad de *Erwinia* spp. [62] o de *Fusarium* spp. [63].

1.3.5. Etiología de la PC

Estudios en Colombia han indicado que el agente causal de las lesiones iniciales es el Oomiceto *Phytophthora palmivora* [2][19][24]. Posteriormente ingresan distintos hongos y bacterias asociados a la enfermedad, para continuar con el proceso de descomposición de la yema, siendo más frecuentes los hongos *Fusarium* sp. y *Thielaviopsis* sp., y bacterias como *Erwinia* sp., *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* sp. (Tabla 2) [64].

Tabla 2. Géneros frecuentes de microorganismos aislados de tejidos procedentes de palmas afectadas con PC [2][64].

Clasificación	Microorganismos asociados a la PC
Oomicetos	<i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> .
Hongos	<i>Fusarium</i> , <i>Thielaviopsis</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Diplodia</i> , <i>Nigrospora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Pestalotia</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Phoma</i> , <i>Cephalosporium</i> y <i>Pirenochaeta</i> .
Bacterias	<i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Enterobacter</i> .

Por otra parte Ronquillo [33], en sus investigaciones sobre palmas en Ecuador, encontró la presencia de los hongos *Fusarium oxysporum* y *F. solani* en plantas enfermas con PC, los cuales sometió a pruebas de patogenicidad y comprobó su capacidad de infectar tejidos sanos al producir lesiones cloróticas con podredumbre. Además, no pudo demostrar que *Phytophthora palmivora* sea el causal de la PC ya que no evidenció su presencia en palmas enfermas.

1.3.6. Comunidades microbianas asociadas a la PC

Las comunidades microbianas que habitan las plantas se localizan en distintas partes de la rizósfera, filósfera y endosfera. Este microbioma está constituido principalmente por

bacterias, hongos, arqueas y protistas que se han adaptado a limitantes de agua y nutrientes, exposición a rayos UV y cambios de temperatura, donde las bacterias es el grupo mayoritario en la filósfera con un promedio de $10^4 - 10^5$ bacterias por cada mm^2 de superficie de la hoja [65][66].

La filósfera está conformada por hojas, órganos aéreos de las plantas, que ofrecen diversos microhábitats para el desarrollo de microorganismos. Estudios [65] sugieren que los microorganismos no patógenos viven como comensales en la planta huésped brindándole apoyo contra infecciones microbianas, posiblemente por una competencia entre microorganismos residentes e invasores. Se presume que tienen un papel importante en la remediación de pesticidas residuales y pueden ser aplicados como biofertilizantes, fitoestimuladores y biopesticidas contra invasores [66].

En Ecuador las primeras observaciones de sintomatología relacionada a la PC datan desde el año 1974 [9] y estudios han revelado la presencia de varios microorganismos, como hongos, oomicetos y bacterias, con una predominancia del género *Fusarium* en los diferentes estadios de la PC [33][67].

Otros estudios llevados a cabo en Shushufindi-Ecuador sobre palmas en diferentes fases de la PC, analizaron varios órganos de las plantas bajo el microscopio electrónico y mediante análisis moleculares sin evidenciar la presencia de fitoplasma o virus [68][69].

1.3.6.1. Oomicetos

Esta clase de microorganismo pertenece al filo Oomycota dentro del Reino Chromista. Anteriormente los oomicetos fueron considerados como hongos inferiores por su crecimiento filamentoso y la capacidad de formar esporas para su reproducción. Sin embargo, análisis filogenéticos han revelado que los oomicetos están más relacionados evolutivamente con algas y plantas terrestres mientras que los hongos están relacionados con los animales [70][71].

En la última década el género *Phytophthora* ha recibido una mayor atención debido al impacto ecológico y económico de varias especies invasoras, existiendo alrededor de 117 entidades taxonómicas distintas [72].

En Colombia se identificó a *Phytophthora palmivora* como el responsable de las lesiones iniciales de la PC de la palma de aceite, cuya patogenicidad fue comprobada en palmas de vivero [2]. *Phytophthora palmivora* es una especie tropical con más de 170 plantas hospederas entre las que se encuentran la palma de aceite, generalmente es capaz de infectar la parte aérea de las plantas, raíces, tallos, flores y frutos [24][51].

En el año 1986 en Shushufindi-Ecuador, frente a brotes de la enfermedad, se buscó Pythiaceas (*Phytophthora* y *Pythium*) mediante el uso de medios de cultivos específicos o trampas en frutas. La proporción baja de aislados positivos encontrados concluyeron que la familia Pythiaceas no intervenían en la enfermedad de PC. Después de las infecciones de PC en Ecuador en los años 1992 y 1993, De Franqueville [4] propuso nuevos experimentos de campo para aislar *Phytophthora*, pero no resultaron concluyentes.

1.3.6.2. Hongos

Los hongos, a diferencia de los oomicetos, son haploides o dicarióticos la mayor parte de su ciclo de vida, presentan hifas septadas y sintetizan lisina mediante la vía α -aminoadipato, mientras que los oomicetos son diploides, sus hifas no son septadas y sintetizan lisina por la vía del ácido diaminopimélico [70].

En esta clasificación el género *Fusarium* es el de mayor interés fitopatológico porque se lo ha asociado a pudriciones de raíz, tallos y hojas de distintas especies de plantas. Por ejemplo, en la palma aceitera la especie *F. oxysporum* se ha relacionado con la marchitez vascular, la cual inicia con una clorosis en ciertas hojas y avanza hasta marchitar toda la planta causando una coloración marrón en el xilema [73][74]. Además las micotoxinas producidas por ciertas especies de *Fusarium* constituyen un riesgo para

la salud humana y animal, pudiendo existir diferentes quimiotipos de micotoxinas de una sola especie en las mismas regiones geográficas [74].

1.3.6.3. Bacterias

Existe una mayor frecuencia de bacterias en los surcos de las células epidérmicas de las hojas debido al agua residual en esta zona. Las bacterias tienden a agruparse en diferentes colonias, cuya distribución es irregular en la superficie de la hoja, permitiendo posiblemente diferentes respuestas en el hospedador [65].

Estudios en Ecuador sobre palmas aceiteras con PC han revelado además la presencia de bacterias del género *Erwinia* y *Pseudomonas* en estados avanzados de la enfermedad. No obstante, han sido consideradas como agentes secundarios porque su inoculación en plantas sanas no han reproducido síntomas de la PC [27][68].

Erwinia es un patógeno gramnegativo y necrotrófico que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, existiendo especies asociadas específicamente a plantas, animales e insectos, pudiendo controlar la homeostasis del hierro durante el ciclo infeccioso. Tiene la capacidad de infectar a una gran variedad de plantas ornamentales y agrícolas como arroz, maíz, tomates, cebollas, papa, manzano, perales y hortalizas [62][75]. Una de las especies, *E. carotovora*, es el patógeno de pudrición blanda más común que actúa ablandando rápidamente los tejidos hasta reducirlos en poco tiempo a una masa acuosa bajo condiciones de humedad y temperaturas óptimas [76].

Por otra parte, el género *Pseudomonas* pertenece a la familia Pseudomonadaceae caracterizándose por ser gramnegativas con forma bacilar y no formadoras de esporas. Algunas especies, como la *P. fluorescens*, han sido aplicadas como controles en el establecimiento o crecimiento de patógenos, tanto en semillas como en suelos [77].

1.3.7. Tecnologías de secuenciación masiva y bioinformática

Las tecnologías de alto rendimiento permiten la evaluación de un espectro más amplio de comunidades microbianas a diferencia de las técnicas de cultivo, sobre todo de microorganismos viables o metabólicamente activos que no son cultivables en medios de cultivo, y para su análisis pueden requerir de una muestra grande o de muestras agrupadas ignorando la heterogeneidad del sistema investigado [66][65]. La secuenciación de amplicones es el procedimiento más usado, sin embargo existen más técnicas que permiten obtener metagenomas que brindan información sobre genes u organismos individuales de un ecosistema en particular [66].

Con el uso de secuenciación de alto rendimiento el ADN microbiano se aísla directamente de la muestra y se secuencia sin cultivar el microorganismo [78], permitiendo investigar comunidades microbianas a través de la secuenciación de genes específicos de microorganismos como bacterias (16S ARNr y 23S ARNr) y hongos (ITS, 18S ARNr y 28S ARN), pudiéndose secuenciar además el genoma completo de los microorganismos [79][80].

Para el análisis bioinformático existen plataformas como QIIME2 (<https://qiime2.org/>) [81] que es de código abierto desarrollada en Python y ejecutada en Linux. Es capaz de realizar análisis metagenómicos sobre las plataformas Illumina e IonTorrent y permite el análisis de microbiomas a través de la secuenciación de amplicones de genes marcadores. Cuenta con complementos (plugin) como DADA2 [82] que permite modelar y corregir errores del amplicón mediante un control de calidad de secuencias. Su flujo de trabajo incluye la demultiplexación, filtrado de calidad, asignación taxonómica, reconstrucción filogenética, análisis y visualizaciones de diversidad [83].

1.3.8. Acción de la planta frente al patógeno

Los hongos emplean enzimas, como la celulasa, para degradar las paredes celulares de las plantas. Tras la detección de estas moléculas fúngicas, las plantas depositan callosa y lignina para fortalecer sus paredes celulares. Asimismo, la planta elabora compuestos

antimicrobianos que se acumulan en altas concentraciones y ayudan a limitar la dispersión del patógeno, como las fitoalexinas y fitoanticipinas [21].

En una forma de represalia evolutiva, las plantas han desarrollado enzimas que degradan los carbohidratos patógenos, incluidas las quitinasas y las β -1-3-glucanasas. Adicionalmente existen diversas proteínas que intervienen en la defensa de la planta como las defensinas, que son propias de plantas pequeñas que atacan directamente o inhiben los microbios invasores y las plantas parásitas[84][85][21].

Adicionalmente, para protegerse de los herbívoros las plantas pueden presentar tricomas y producir sustancias pegajosas, como la resina y el látex que atrapan insectos. Además de muchos componentes celulares, como los flavonoides, taninos, terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos [86]. También algunos simbioses, como las rizobacterias [87] y micorrizas arbusculares [88][89], ayudan a la planta en la defensa contra patógenos.

1.3.8.1. Fenoles

Son metabolitos secundarios producidos por las plantas durante su interacción con el entorno, constituyendo un soporte mecánico para la planta al aumentar la dureza del cuerpo vegetativo y en la coloración de hojas y frutos, además protegen contra patógenos, herbívoros y radiación ultravioleta. La producción de fenoles está influida por variaciones ambientales, fertilizaciones, factores genéticos, daños causados por plagas y enfermedades, encontrándose concentraciones heterogéneas en toda la planta y limitándose a ciertos órganos, células y tejidos [90].

Dentro de este grupo se encuentran: a) Los flavonoides, que controlan los niveles de auxinas reguladoras del crecimiento y la diferenciación de las plantas. b) la lignina, que se produce por acción de las peroxidasas mediante la polimerización de los compuestos fenólicos cuando la planta presenta lesiones, estrés o requiere protegerse del entorno, aumentando la lignificación con la edad del tejido, por ende los tejidos jóvenes resultarían más susceptibles a factores bióticos y abióticos [90].

1.3.8.2. Carácter antioxidante

Los antioxidantes como flavonoides, taninos, antocianinas y otros constituyentes fenólicos, son sustancias que retrasan o evitan la oxidación de un sustrato [91]. En los últimos años ha habido interés en el estudio de los radicales libres que participan, en la perturbación metabólica que resulta de lesiones tisulares y enfermedades. El oxígeno reactivo, como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, se producen en las mitocondrias y microsomas de la célula bajo condiciones fisiológicas normales. Estas especies reactivas generan estrés oxidativo en las plantas, lo que desencadena reacciones de señalización y de defensa [92][93].

1.3.9. Controles biológicos

Los patógenos como hongos, bacterias, virus y nemátodos, se caracterizan por causar graves daños a cultivos en todo el mundo, reduciendo la calidad, cantidad de producción y seguridad del producto. En consecuencia, existe un gran interés en desarrollar alternativas seguras, ecológicas y efectivas que no dependan del uso de fungicidas químicos para el manejo y control de enfermedades. Algunas alternativas incluyen fitomejoramiento para desarrollar variedades resistentes, mejoramiento genético, uso de agentes biológicos y buenas prácticas agrícolas [94].

El control biológico se logra mediante la inducción de mecanismos biológicos o por acción antagonista de cepas microbianas que previenen el establecimiento o infección de cepas patógenas. Los agentes de control biológico suelen ser cepas bacterianas o fúngicas provenientes de la filósfera, endosfera o rizósfera, por ejemplo *Trichoderma* spp., *Saccharomyces*, *Bacillus thuringiensis*, *Pichia anomala*, *Pythium oligandrum*, *Candida oleophila*, etc. [94][95]. Los agentes antagonistas pueden mostrar varios mecanismos directos o indirectos para el control biológico de la enfermedad, como son antibiosis, microparasitismo, resistencia inducida para activar la respuesta de defensa en las plantas contra patógenos y mejora de crecimiento de plantas y reducción de los efectos de la enfermedad [94].

1.3.9.1. Género *Trichoderma*

Es un género caracterizado por mostrar una gran capacidad para degradar las paredes celulares de patógenos. Se encuentran colonizando cualquier material celulósico así como la rizósfera de las plantas. Se han considerado como potenciales agentes biológicos, ejerciendo un efecto positivo en el crecimiento de las plantas además de inducir una resistencia sistémica contra patógenos. Su acción antagonista se debe a mecanismos de competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis [96].

Trichoderma es capaz de excretar un antimicótico (gliotoxina) tóxico para hongos patógenos [94], de mostrar hiperparasitismo contra muchos patógenos [95] y de activar el mecanismo de resistencia sistemática inducida en la planta, al desencadenar las cascadas de señalización del ácido jasmónico y de etileno, las cuales activan enzimas de defensa como las hidropéroxido liasas, peroxidasa y fenilalanina amoniaco liasas. También es capaz de inducir la expresión de proteínas responsables de matar a los patógenos invasores, inducir reacciones de hipersensibilidad y reforzar paredes celulares de plantas mediante la activación de una respuesta sistémica mediada por el ácido salicílico [97].

1.3.9.2. Levaduras

Muchos de estos hongos unicelulares (*Candida oleophila*, *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia fructicola*, *Cryptococcus albidus*, *Saccharomyces cerevisiae*) se han descrito como potenciales antagonistas de varios patógenos vegetales, aunque su uso como control biológico todavía está poco explotado. Tienen requisitos de cultivo poco exigentes, preocupaciones limitadas de bioseguridad, aplicabilidad y resistencia al estrés [98].

Para las levaduras el hierro es uno de los nutrientes más buscados y la competencia por el hierro es reconocida como un modo de acción importante [99][100]. Los mecanismos antagonistas involucran la competencia por nutrientes y espacio, secreción de enzimas,

la producción de toxinas, la liberación de compuestos orgánicos volátiles (hidrocarburos, alcoholes, tioalcoholes, aldehídos, cetonas, tioésteres, ciclohexanos, compuestos heterocíclicos, fenoles y derivados de benceno), el micoparasitismo y la inducción de resistencia en las plantas [98].

En pruebas de antagonismo, algunas cepas de *S. cerevisiae* redujeron el crecimiento de patógenos vegetales como *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium graminearum* e inhibieron las micotoxinas producidas por estos hongos [98][101][102][103].

1.3.9.3. Género *Bacillus*

Son un grupo de bacterias grampositivas que se caracterizan por ser ubicuas y producir una amplia gama de compuestos antagonistas contra bacterias, hongos y virus. Del 5 al 8% de su genoma total está dedicado a la síntesis de metabolitos secundarios. Las cepas productoras de lipopéptidos (tres familias principales: surfactina, iturrinas y fengicinas) presentan una mayor capacidad inhibitoria de patógenos [104]. Estudios con *Bacillus subtilis* han mostrado un efecto antifúngico contra cepas de *Fusarium* por la producción de fengicinas, confirmando la dominancia de la familia de lipopéptidos [105][106].

Los mecanismos de acción de los principales lipopéptidos están determinados por su capacidad de interactuar con la membrana celular del patógeno. La surfactina capaz de integrarse a la membrana celular, mediante interacciones hidrofóbicas, para desestabilizar su estructura y provocar una ruptura. Mientras que la iturina se caracteriza por atravesar la pared celular de hongos formando pequeñas vesículas que alteran la permeabilidad de la membrana y provocan la fuga de iones potasio, y del mismo modo las fengicinas buscan solubilizar completamente la membrana mediante la formación de poros [104].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Analizar la etiología de la enfermedad de pudrición del cogollo (PC) en cultivos de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) para detectar microorganismos patógenos mediante el empleo de técnicas dependientes de cultivo y secuenciación de alto rendimiento.

2.2. Objetivos específicos:

- Detectar microorganismos patógenos asociados a la enfermedad de PC mediante secuenciación masiva con tecnologías de nueva generación.
- Diseñar estrategias de aislamiento dirigido en base a los resultados de secuenciación masiva.
- Identificar los microorganismos patógenos aislados por técnicas dependientes de cultivo mediante secuenciación Sanger.
- Comprobar la patogenicidad de los microorganismos causantes de la PC en palma aceitera.
- Construir árboles filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas de los microorganismos.
- Cuantificar los fenoles totales de las plantas sanas y enfermas mediante el método de Folin-Ciocalteu.
- Determinar la capacidad antioxidante de plantas sanas y enfermas utilizando los métodos FRAP, ABTS y DPPH.
- Evaluar la actividad antagónica de agentes biológicos y químicos contra los microorganismos causales de la enfermedad de PC.

2.3. Posibles contribuciones de la tesis:

Las principales contribuciones que se pretenden con este trabajo son:

- Puesta a punto de un método estandarizado para extracción de ADN total del cogollo de palma aceitera que sea de fácil manejo, económico y que permita obtener valores altos en cantidad de ADN y absorbancias dentro del rango óptimo.
- Describir la composición de hongos y bacterias en plantas sanas y enfermas con PC en Ecuador, mediante análisis de secuenciación masiva y técnicas dependientes de cultivo.
- Realizar un análisis metataxonómico para conocer las interacciones entre hongos y bacterias en diferentes estadios de la PC.
- Identificar posibles patógenos causales de la PC en palma aceitera en Ecuador, con base en los postulados de Koch y sintomatología de la enfermedad.
- Obtener hongos antagonistas con la capacidad de enmascarar e inhibir el crecimiento de los posibles patógenos causales de la PC y que sirvan como una alternativa de control biológico de la PC.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo

Se recolectó muestras de cogollo y hojas de palmas aceiteras aparentemente sanas y con sintomatología congruente con el primer y segundo estadio de la PC. De cinco puntos del cantón Quinindé (0°20'N 79°29'O) de la provincia de Esmeraldas se colectaron 15 muestras en total, que correspondieron a 5 muestras por cada estadio y 5 sanas (Tabla 3).

Tabla 3. Muestras de cogollo y hojas recolectadas en cinco puntos del cantón Quinindé de la provincia de Esmeraldas.

Punto de muestreo	Código muestra cogollo	Código muestra hoja	Sintomatología	Código estado de la muestra
1	E0P1C	E0P1H	Sana	E0
	E1P1C	E1P1H	Estadio 1 PC	E1
	E2P1C	E2P1H	Estadio 2 PC	E2
2	E0P2C	E0P1H	Sana	E0
	E1P2C	E1P1H	Estadio 1 PC	E1
	E2P2C	E2P1H	Estadio 2 PC	E2
3	E0P3C	E0P1H	Sana	E0
	E1P3C	E1P1H	Estadio 1 PC	E1
	E2P3C	E2P1H	Estadio 2 PC	E2
4	E0P4C	E0P1H	Sana	E0
	E1P4C	E1P1H	Estadio 1 PC	E1
	E2P4C	E2P1H	Estadio 2 PC	E2
5	E0P5C	E0P1H	Sana	E0
	E1P5C	E1P1H	Estadio 1 PC	E1
	E2P5C	E2P1H	Estadio 2 PC	E2

Con un cuchillo malayo, previamente desinfectado, se cortó la flecha y posteriormente se realizó otro corte en sentido longitudinal a nivel del cogollo para reducir la incidencia

de lesiones. Trozos de tejido sintomático y sano se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético de manera individual y se almacenaron en frío cuidando que las muestras no tuviesen contacto directo con el hielo durante su transporte al laboratorio.

Las palmas aparentemente sanas seleccionadas no presentaron clorosis ni necrosis en hojas jóvenes (Figura 3, A). El primer estadio incluyó a palmas con clorosis de hojas jóvenes y lesiones necróticas menores en la flecha (Figura 3, B y C).



Figura 3. Cultivos de palma aceitera: A) Sana, B) Primer estadio de la PC, C) Parte interna del cogollo en primer estadio de la PC.

El segundo estadio correspondió a palmas con amarillamiento de hojas, pudrición de flecha y cogollo (Figura 4, A y B). En el tercer estadio, las hojas eran de color café, estaban secas y existió pudrición húmeda del meristemo con olor fétido (Figura 4, C).



Figura 4. Cultivos de palma aceitera en varios estadios de la PC: A) Segundo estadio de la PC, B) Flecha en segundo estadio de PC, C) Tercer estadio de la PC.

3.2. Procesamiento de muestras

Las muestras de cogollo se usaron para la identificación microbiológica y molecular de los potenciales agentes patógenos y las hojas para la evaluación del carácter antioxidante y cuantificación de fenoles totales.

Las muestras de cogollo se lavaron con agua potable para limpiar restos de materia orgánica, seguido de un lavado con agua destilada estéril. La desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto y etanol al 70% por 30 segundos, seguido de dos lavados con agua destilada estéril y secado con papel toalla previo a la extracción del ADN y siembra en diferentes medios de cultivo [42]. Adicionalmente muestras de cogollo se almacenaron a -80°C .

Para la preparación de extractos metanólicos, las hojas recolectadas se lavaron y secaron con papel toalla. Consecutivamente se dejaron a temperatura ambiente sin luz durante dos semanas aproximadamente para un secado natural del material vegetal, después se pulverizaron y se hicieron alícuotas con una relación de 2g de muestra en 10 mL de metanol al 99.5% (Lobal Chemie). Se maceró por 24 horas en oscuridad y se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Luego con un filtro milipore de $0.22\ \mu\text{m}$ se filtró el sobrenadante para obtener los extractos metanólicos que se almacenaron a 4°C hasta su posterior evaluación [107].

3.3. Extracción de ADN total del cogollo

Para la extracción de ADN total de las muestras se probaron algunos protocolos de extracción de ADN (Tabla 4) debido a la dureza del cogollo de la palma. Se aplicó una disrupción celular, como el uso de calor, trituración con perlas de vidrio, en mortero y con nitrógeno líquido. Estos protocolos se evaluaron por triplicado con la finalidad de obtener una mayor cantidad y mejor calidad de ADN total.

La integridad del ADN total se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en 40 mL de buffer TBE 1X, con 10 μL del visualizador SYBR GOLD 1000X

(Thermo Fisher Scientific, USA). En cada pocillo del gel se adicionaron 3 μ L de muestra o del marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) y 3 μ L del buffer de carga.

Tabla 4. Protocolos de extracción de ADN total de muestras de cogollo de palma aceitera.

Tratamiento	Protocolo	Cita
T1	Kit Plant ExAmp Extraction Buffer ABM	[108]
T2	Protocolo de OPSDiagnostics	[109]
T3	Protocolo CTAB de Doyle con trituración de trozos de cogollo ultracongelado a -80°C con perlas de vidrio	[110][111]
T4	Protocolo CTAB de Doyle con trituración de trozos de cogollo ultracongelado a -80°C en mortero	[110][111]
T5	Protocolo de Wilson con trituración del cogollo en mortero y con una hora de precipitación del ADN	[112]
T6	Protocolo de Wilson con trituración del cogollo en mortero, con doble centrifugación y 24 horas de precipitación del ADN	[112]
T7	Protocolo de Wilson con trituración del cogollo en nitrógeno líquido	[112]
T8	Protocolo de Weising con trituración del cogollo en nitrógeno líquido	[113]
T9	Protocolo de Wilson con trituración del cogollo en licuadora.	[112]

Para el análisis del mejor protocolo de extracción se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y se realizó un diseño completamente al azar (DCA), donde la variable respuesta fue la cantidad de ADN obtenido. Finalmente, el tratamiento con mayores cantidades de ADN se seleccionó mediante la prueba de Tukey. El ADN total extraído de las muestras se dividió en varias alícuotas y se almacenó a una temperatura de -20°C.

3.4. Amplificación del ADN total mediante PCR

Para evidenciar la presencia de hongos, bacterias y oomicetos en los extractos de ADN total, se emplearon los primers universales 16S ARNr, ITS y COX II (Tabla 5). Como control positivo para hongos se empleó a *F. solani* y para oomicetos a *Phytophthora infestans* al no contar con aislados de la especie *P. palmivora*. Las reacciones PCR se

efectuaron con las programaciones indicadas en la Tabla 6 y con los componentes y cantidades listados en la Tabla 7.

Tabla 5. Primers usados para amplificación de los genes 16S ARNr, ITS y CoxII.

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Referencia
16S ARNr (Bacterias)	27F	AGATTTGATYMTGGCTCAG	[114]
	1492R	ACGGYTACCTTGTTACGACTT	[114]
ITS (Hongos)	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[115]
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	[115]
ITS (Oomicetos)	ITS 3oo	AGTATGYTGTATCAGTGTC	[116]
CoxII (Oomicetos)	FM82	TTGGCAATTAGGTTTTCAAGATCC	[117]
	FM78	ACAAATTTCACTACATTGTCC	[118]

Tabla 6. Programación del termociclador para la amplificación por PCR.

Programa	Temperatura (Tiempo)						
	DI	C	D	A	E	EF	F
ITS1-ITS4 (Hongos) COX II (Oomicetos)	95°C (2 min)	30	95°C (1 min)	55°C (1 min)	72 °C (1.5 min)	72 °C (10 min)	4°C
ITS4-ITS3oo (Oomicetos)	95°C (15 min)	35	95°C (0.5 min)	58°C (0.5 min)	72 °C (1 min)	72 °C (10 min)	4°C
27F-1492R (Bacterias)	94°C (5 min)	35	94°C (1 min)	50°C (1 min)	72 °C (1 min)	72 °C (10 min)	4°C

DI, desnaturalización inicial; C, ciclos; D, desnaturalización; A, anillado; E, extensión; EF, extensión final; F, final.

Tabla 7. Detalle de componentes utilizados para la amplificación por PCR.

Componentes	Concentración	Cantidad (µL) ^a	Cantidad (µL) ^b
Agua libre de ARNasas	-	9.5	9.5
PCR TaqMasterMix (ABM)	2X	12.5	12.5
Primer F	10 µM	1.25	1
Primer R	10 µM	1.25	1
ADN	100 ng/µL	0.5	1
Volumen Total		25	25

^a Para primers ITS1-ITS4, FM82-FM78, 27F-1492R.

^b Para primers ITS4-ITS3oo

Los amplicones obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 1.2%, observando presencia o ausencia de bandas de acuerdo al gen analizado y comparando con su respectivo control positivo. Para la secuenciación masiva se seleccionaron las muestras que en la electroforesis presentaron las mismas bandas que su control positivo.

3.5. Identificación molecular mediante secuenciación masiva y análisis bioinformático

Los extractos crudos de ADN fueron procesados por la empresa Novogene Corporation Inc. mediante la plataforma Illumina NovaSeq 6000. Se utilizaron los primers 341F-806R (341F-CCTACGGGNGGCWGCAG, 806R- GGACTACNNGGTATCTAAT) para bacterias y los primers ITS 3F-4R (3F GCATCGATGAAGAACGCAGC; 4R TCCTCCGCTTATTGATATGC) para hongos. La secuenciación masiva generó lecturas pareadas (paired-end) de ~250 pb.

Para el análisis bioinformático de los genes ITS y 16S ARNr se utilizó la plataforma QIIME2 v.2021.4 [81][119] en Python v.3.6.13 de Ubuntu v.16.04. En primer lugar se creó un archivo de metadatos en formato “.tsv” para cada gen con la información de las muestras. Cada muestra estuvo conformada por lecturas forward y reverse en formato FASTQ.

En QIIME2 se realizó la importación de secuencias en formato demultiplexado de extremo emparejado de Casava 1.8 y con el comando *qiime demux summarize* se observó la calidad de 10000 secuencias muestreadas al azar. Usando el plugin DADA2 [83] con el método *denoise-paired*, se eliminó el ruido constituido por regiones de baja calidad y secuencias de primers.

Para la asignación taxonómica se trabajó con clasificadores taxonómicos de las bases de datos de referencia de Greengenes (v.13.8) para bacterias y UNITE (v.8.2) para hongos [120], estas bases de datos fueron entrenadas previamente con el algoritmo clasificador Naive Bayes. A continuación se clasificó las lecturas por taxón utilizando *classify-sklearn* [121][122] para obtener secuencias con similitud superior al 99% y finalmente

se generaron tablas de variantes de secuencia de amplicón (ASV) y gráficos de los perfiles taxonómicos que se visualizaron con Qiime view (<https://view.qiime2.org/>) [123]. Adicionalmente para el caso de bacterias, se realizó una limpieza de secuencias de mitocondrias y cloroplastos.

Los análisis de diversidad alfa y beta se realizaron en QIIME2 y R a partir de la clasificación taxonómica a nivel de género.

3.6. Diseño de estrategias de aislamiento dirigido

Se diseñaron estrategias de aislamiento de los posibles patógenos, sembrando por triplicado trozos de cogollo desinfectado (Sección 3.2) de 1 a 2 cm, conteniendo tanto tejido sano como enfermo y se diseñaron estrategias de aislamiento de los posibles patógenos [42][124].

3.6.1. Aislamiento de bacterias

Las muestras se sembraron en agar nutriente (Himedia) por triplicado y se dejaron incubar a 28°C entre 24 a 72 horas [2][124].

3.6.2. Aislamiento de hongos y oomicetos

Para hongos en general se utilizó agar papa dextrosa (PDA, Difco) adicionado con cloranfenicol (0.01%) de la marca Himedia, PDA con ácido láctico (Himedia) al 1%, agar avena, agar agua (AA) al 2% (Bacto Agar Difco), agar harina de maíz (CMA) de la marca Difco y agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) [125] para *Fusarium*. Para oomicetos agar centeno, agar V8-J (PARPV₈ y P₁₀VP) y agar harina de maíz modificados [2][124][126][127]. Finalmente se mantuvieron los cultivos a temperatura ambiente (~25°C) durante una semana [2].

Además se utilizaron cámaras húmedas para estimular el crecimiento de estructuras de hongos, colocando papel toalla impregnado de agua estéril para mantener la humedad necesaria [124].

3.7. Identificación de microorganismos

3.7.1. Identificación de bacterias

A las 48 horas se revisaron los crecimientos en agar nutriente y se reaislaron en un nuevo agar mediante siembra por estrías para la obtención de colonias separadas. Se realizaron pruebas bioquímicas manuales que consistieron en la tinción Gram de las colonias para determinar la morfología de las bacterias, así como la prueba de oxidasa (Oxidase Strip de Merck) para determinar la presencia de la enzima del mismo nombre y la prueba catalasa (Agua oxigenada al 3% marca Lira) para separar géneros fitopatógenos. Además se realizaron inoculaciones de colonias en medio de úrea (Invitrogen) y en medio SIM (BD) para diferenciar bacterias entéricas mediante la producción de sulfuro y motilidad [128].

También se inoculó rodajas de papa con cada colonia bacteriana para verificar podredumbre blanda. Las rodajas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 2 minutos, se cortaron en rodajas de 1 cm de grosor, se inocularon con cada aislado y colocaron sobre un portaobjetos en cajas de Petri con papel filtro impregnado con 5 mL de agua destilada estéril. Las rodajas inoculadas se incubaron a 28°C durante 48 horas [129]. Finalmente, las cepas con ciertas características, de acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas, se identificaron mediante secuenciación Sanger.

3.7.2. Identificación de hongos y oomicetos

Para identificar los aislados fúngicos y oomicetos se consideró las características macroscópicas en medios de cultivo (textura y coloración del cultivo) y las características microscopias observadas mediante la técnica de tinción con azul de lactofenol y el uso de claves taxonómicas morfológicas [130][131][132]. Para la

purificación de las cepas se realizaron diluciones 10^{-5} y se sembraron en PDA para separar posibles consorcios fúngicos.

3.8. Identificación molecular de aislados

3.8.1. Extracción de ADN de aislados

La extracción del ADN de aislados fúngicos y bacterianos se llevó a cabo mediante el método de Minipreps [113].

Para el caso de hongos, los cultivos monospóricos se inocularon en caldo YPD (20 g de extracto de levadura (BD), 10 g de peptona (BD) y 10 g de dextrosa (BD) en un litro de agua destilada) y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una semana. Posteriormente la extracción de ADN se realizó con 200 a 500 mg del micelio, el mismo que se trituró con micropistilos.

Para la extracción de ADN de cultivos bacterianos se realizaron siembras en caldo nutriente de cada cultivo con un periodo de incubación de 24 horas a 25°C. Se tomó 1.5 mL del cultivo y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se repitió el mismo proceso para obtener una buena concentración de pellet.

3.8.2. Amplificación de ADN de aislados mediante PCR

Para la identificación molecular se empleó los primers universales ITS4-ITS5 (4 TCCTCCGCTTATTGATATGC; 5 GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) para hongos y 27F-907R (27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; 907R CCGTCAATTCMTTTRAG TTT) para bacterias. La amplificación por PCR se llevó a cabo empleando la PCR Taq Master Mix de ABM (12.5 μ L), añadiendo a cada reacción 0.5 μ L de ADN molde, 1.25 μ L de cada primer (10 μ L) en un volumen total de 25 μ L.

Para la región ITS se programó con un ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, una temperatura de

anillado de 58°C por 30 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C por 30 segundos y un ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

Para la región 16S se programó con un ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 minuto, una temperatura de anillado de 50°C por 1 minuto, una temperatura de extensión de 72 °C por 1 minuto y un ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en gel de agarosa (Sigma) al 1,5% con el visualizador SYBR Green (Invitrogen). La electroforesis se realizó a 90 V por un tiempo de 40 minutos. Se utilizó un marcador molecular 1 Kb plus ADN Ladder (Invitrogen). Finalmente se observó el gel de agarosa en el UV-transiluminador [133].

3.8.3. Secuenciación Sanger y alineamiento en bases de datos

Los productos de PCR obtenidos, con un volumen de 25 µL a una concentración de aproximadamente 100 ng/µL de cada muestra, se enviaron al servicio de secuenciación Sanger de la empresa ©Macrogen Inc. en Seúl, Corea del Sur. Con el software bioinformático BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) se limpiaron las regiones de mala calidad de lectura, se alinearon y se creó la secuencia consenso. Finalmente, mediante la herramienta en línea BLAST se buscó la secuencia homóloga con mayor identidad a nivel de nucleótidos, a partir de la similitud (80 a 100%) con secuencias disponibles en las bases de datos (*rRNA/ITS databases*) de GenBank.

3.8.4. Análisis filogenético

El análisis filogenético de los aislados se realizó con MEGA versión X [134], en primer lugar se obtuvo las secuencias consenso de mejor calidad de cada aislado en el programa BioEdit, posteriormente se alinearon todas las secuencias con Clustalw del programa MEGA X y después se buscó el modelo evolutivo que mejor se ajustó a la construcción filogenética.

El árbol filogenético de hongos se construyó mediante el método de máxima verosimilitud con un *bootstrap* de 1000 repeticiones [135]. Las secuencias de *Fusarium oxysporum* (MF467275.1), *Fusarium sacchari* (MC464630.1), *Fusarium cyanescens* (AB190389.1), *Fusarium ferrugineum* (LT46276.1 y LT46277.1), *Fusarium ambrosium* (MT179765.1), *Fusarium* sp. (MH884135.1 y LC476551.1), *Fusarium ambrosium* (KR610401.1) y *Fusarium solani* (MK968891.1 y MK446913.1) depositadas en la base de datos de GenBank, se incluyeron como especies de referencia junto con las secuencias del género *Fusarium* obtenidas en este estudio. La especie *Penicillium janthinell* (GU981585.1) se usó como grupo externo para la construcción del árbol evolutivo.

3.9. Pruebas de patogenicidad

Para comprobar la capacidad infectiva de los agentes patógenos asociados a la PC, se trabajó con 93 plantas de palma aceitera de seis meses de edad de la variedad Tenera INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) certificadas como material tolerante a la PC (Figura 5). Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en invernadero con el fin de conservar la humedad y temperatura.

Se seleccionaron nueve cepas fúngicas en base a su frecuencia y asociación con la PC. Para la preparación de las suspensiones fúngicas se tomó cada cepa en cajas de Petri y se realizaron lavados con agua destilada estéril para obtener suspensiones de esporas, cuya concentración se midió en cámara Newbauer y se ajustó a 10^7 conidios/esporas mL^{-1} [136].



Figura 5. Plantas de palma aceitera de seis meses de edad de la variedad Tenera INIAP.

Se inocularon tres plantas con cada cepa fúngica, tres plantas con la mezcla de las cepas fúngicas y como control a tres plantas con agua destilada estéril. La inoculación se realizó por tres métodos: a) Punción de 200 uL de suspensión fúngica, ó agua destilada estéril para el caso del control, en ambos lados de la base de la hoja más joven de cada planta. b) Contacto del aislado en PDA, ó PDA estéril para el caso del control, con la hoja más joven y sujeta con plástico film para mantener la humedad del agar y c) Goteo de 1 mL de la suspensión fúngica, ó agua destilada estéril para el caso del control, en la superficie de la hoja más joven (Figura 6). Adicionalmente para mantener la humedad cada planta se cubrió con una funda plástica y se siguió un régimen de riego de tres veces por semana con agua corriente.



Figura 6. Pruebas de patogenicidad. Izquierda) Inoculación por punción. Derecha) Inoculación por contacto.

3.9.1. Evaluación de síntomas

Se realizó un seguimiento semanal para observar cambios de color en las hojas inoculadas de cada planta. Los síntomas de cada planta se evaluaron de acuerdo a la escala de severidad desarrollada por Cenipalma para palmas jóvenes (Tabla 8) [137][138][139][140][141]. Para evaluar el método de inoculación y las capacidades patogénicas de los aislados fúngicos se empleó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA).

Tabla 8. Grado de síntomas externos de pudrición de cogollo en palma aceitera [137][138][139][140][141]

Grado	Síntomas
0	Flecha sin lesiones
1	Flecha con lesiones necróticas que cubren un área entre 0.1% y 20%
2	Flecha con lesiones necróticas que cubren un área entre 20.1 y 40%
3	Flecha con lesiones necróticas que cubren un área entre 40.1 y 60%
4	Flecha con lesiones necróticas que cubren un área entre 60.1% y 80%
5	Flecha con lesiones necróticas que cubren un área mayor al 80.1%

3.9.2. Reaislamiento de patógenos a partir de plantas sintomáticas

El tejido foliar sintomático de las plantas inoculadas se cortó a nivel de la interfase de tejido sano/enfermo en cuadrados de 1 cm. Las muestras se lavaron con agua corriente, posteriormente se desinfectaron con etanol al 70% y una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto cada uno, y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril [42].

Con papel toalla estéril se retiró el exceso de humedad de las muestras de tejido y se inoculó en PDA, colocando tres pedazos de tejido sintomático de cada planta e incubando a temperatura ambiente durante una semana. Los resultados se compararon morfológicamente con cada uno de los aislados inicialmente inoculados en las plantas de palma con el objetivo de comprobar su presencia.

3.10. Evaluación de la actividad antagónica

Las pruebas de antagonismo se realizaron con las cepas de mayor capacidad infectiva de acuerdo a las pruebas de patogenicidad. Las inoculaciones del patógeno y controles se realizó mediante la técnica de cultivo dual en medio PDA a temperatura de 25 °C, colocando 5 mm del cultivo antagonista a una distancia de 5 cm del cultivo fitopatógeno. Los controles del patógeno se inocularon en el centro de cada caja de Petri y cada tratamiento tuvo tres repeticiones.

Se trabajó con controles biológicos y químicos para evaluar la capacidad de inhibir la actividad de hongos fitopatógenos. Como controles biológicos se utilizó cepas fúngicas nativas del cogollo que fueron identificadas como *Trichoderma* sp., *Trichoderma koningii*, *Trichoderma atroviride*, y *Sacharomyces* sp. [142][143][144] [145]. Como controles químicos [146][147][148] se evaluó fungicidas como Benomil (Benomy1 50 PM de Espagrotec), PCNB (Terraclor®) e Himexazol (Tachigaren®).

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) se evaluó a los 7 días de la inoculación del antagonista mediante la Ecuación 1.

$$PICR = \left(\frac{R_1 - R_2}{R_1} \right) \times 100$$

(Ecuación 1)

Donde R_1 es el crecimiento radial del control en el cultivo dual, y R_2 es el crecimiento radial del patógeno en el cultivo dual.

Los datos se analizaron como un diseño completamente al azar, donde la variable respuesta fue el porcentaje de inhibición de los controles biológicos y químicos frente a las cepas fitopatógenas vinculadas a la PC.

3.11. Determinación de fenoles totales

El contenido total de fenoles se realizó con el método colorimétrico Folin-Ciocalteu modificado. En 10 μL del extracto se adicionó agua destilada hasta completar 500 μL , posteriormente se agregaron 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (grado analítico, Sigma-Aldrich) y se dejó reposar por 5 minutos. Luego se adicionaron 1250 μL de Na_2CO_3 (J.T Baker) al 20% p/v y se dejó en oscuridad por 2 horas. Para evaluar el contenido de fenoles se preparó una solución patrón de ácido gálico (grado analítico, Sigma-Aldrich) en concentraciones crecientes entre 0 a 20 mg/mL, que sirvió para construir la curva de calibración. Finalmente se leyó la absorbancia a 725 nm y el contenido de fenoles totales se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de materia seca [149][150][92].

3.12. Evaluación del carácter antioxidante

3.12.1. Por el método FRAP

Se elaboró el reactivo FRAP diluyendo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina, grado analítico, Sigma) en buffer acetato 0.3 M (Invitrogen) con un pH de 3.6 y cloruro férrico hexahidratado (Sigma) a 20 mM. Se adicionó 100 μL del extracto diluido de cada muestra con 3 mL de FRAP con 300 μL de agua destilada y se mantuvo durante 4 minutos a oscuridad y temperatura ambiente. Las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 593 nm teniendo como blanco toda la mezcla de reactivos con 100 μL de metanol que reemplazó a los extractos. La curva de calibración se llevó a cabo con gradientes de concentración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) disueltos en metanol (Lobal Chemie) desde 100 hasta 1100 μM . Los análisis se llevaron a cabo por triplicado, expresando los resultados en μmol de Fe^{2+} por g de muestra [150].

3.12.2. Por el método DPPH

Se preparó una solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, grado analítico, Sigma) a una concentración de 20 mg/L en metanol. Luego se tomó alícuotas de 1 mL de cada

muestra por triplicado y se agregó 5 mL de solución de DPPH, agitando vigorosamente y se dejó en reposo por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La curva de calibración se elaboró con gradientes de concentración desde 0.1 a 1.5 mM, adicionando 100 µL de Trolox (grado analítico, Sigma-Aldrich) en DPPH 0.15mM. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 517 nm frente a un blanco. El resultado se expresó como porcentaje de inhibición de DPPH mediante la Ecuación 2 [92].

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_o - A_m}{A_o} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde A_o es la absorbancia del blanco, y A_m es la absorbancia de las muestra.

3.12.3. Por el método ABTS

Se preparó las soluciones de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), grado analítico, MP Biomedicals) de 7mM y persulfato potásico de 2.45mM y se mezcló ambas soluciones en partes iguales manteniéndolas en oscuridad por 16 horas. Luego se mezcló con 50 mL de etanol y se tomó 1 mL de la solución para mezclar con 100 µL de extracto. Se dejó en incubación a 30°C durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La curva de calibración se llevó a cabo con la adición de 20 µL de Trolox (grado analítico, Sigma-Aldrich) con un gradiente de concentración, desde 0.1 hasta 1 mM, en la mezcla. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 730 nm. El resultado se expresó como porcentaje de inhibición de ABTS mediante la Ecuación 2 [150].

4. RESULTADOS

4.1 Puesta a punto de un protocolo de extracción de ADN total de muestras de palma

Las muestras de cogollo de palmas con PC y sanas se usaron para el análisis microbiológico y molecular. Las muestras de hojas se emplearon para cuantificación de fenoles y capacidad antioxidante. No se incluyó al tercer estadio puesto que presentó un crecimiento masivo en las pruebas de laboratorio, resultado del avanzado estado de putrefacción del tejido.

Se comparó diferentes técnicas de extracción de ADN de muestras de cogollo tomando en cuenta la cantidad y calidad del ADN extraído, realizando tres repeticiones por cada tratamiento. Los resultados de los nueve tratamientos descritos anteriormente en el apartado 3.3. se resumen en la Tabla 9. El análisis estadístico realizado en el programa InfoStat evidenció una diferencia estadística significativa para la variable cantidad de ADN, resultando diferentes las medias de los tratamientos con un valor $p = 0.0008$ (Tabla 10).

La prueba de Tukey se realizó para comparar las medias entre tratamientos y se observó que el tratamiento de extracción de ADN mediante los protocolos de Wilson con trituración del cogollo en nitrógeno líquido (Tratamiento T7) y el de Wilson con triturado manual del cogollo en mortero (Tratamiento T6) fueron los que obtuvieron mayor concentración de ADN por muestra procesada, por ende se sitúan en el mayor rango de significancia como se muestra en la Tabla 11.

En la Figura 7 se puede observar los diferentes tratamientos de extracción de ADN total, donde la longitud de la barra representa la concentración de ADN total respecto al método de extracción de cada tratamiento. Pese a que visualmente se evidencia una leve diferencia entre los tratamientos T7 y T6, estadísticamente esta diferencia no fue

significativa, por ese motivo con ambos tratamientos se puede obtener una mayor concentración de ADN total a partir de las muestras de cogollo de palma aceitera.

Tabla 9. ADN total extraído en cada tratamiento y cuantificado en Nanodrop.

Tratamiento	Repetición	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación 260/280	Relación 260/230
T1	I	1082.00	1.35	2.33
	II	1223.50	1.34	1.73
	III	2107.40	1.34	1.68
T2	I	4.40	1,27	0.5
	II	10.50	1,35	0.51
	III	10.53	1.35	0.53
T3	I	102.00	1.42	0.43
	II	390.00	1.77	0.95
	III	513.00	1.70	0.78
T4	I	174.00	1.16	0.29
	II	124.00	1.24	0.31
	III	149.00	1.20	0.29
T5	I	1872.00	2.02	1.59
	II	1930.00	1.95	1.36
	III	545.60	1.96	1.24
T6	I	1503.00	1.98	1.42
	II	1580.00	1.97	1.39
	III	1553.00	1.94	1.28
T7	I	513.60	1.49	0.67
	II	2475.00	1.92	1.04
	III	1889.00	1.77	1.27
T8	I	1293.00	1.88	1.24
	II	1203.00	2.03	1.47
	III	1248.00	1.96	1.36
T9	I	516.20	1.72	0.91
	II	476.90	1.73	0.88
	III	482.00	1.72	0.89

Tabla 10. Análisis de la varianza para la variable concentración de ADN en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	10593784.33	8	1324223.04	6	0.0008
Tratamiento	10593784.33	8	1324223.04	6	0.0008
Error	3969696.33	18	220538.68		
Total	14563480.66	26			

Tabla 11. Prueba Tukey para la variable concentración de ADN en InfoStat.

Tratamientos	Medias ^a	n	E.E.	Resultado*
T7	1625.87	3	271.13	A
T6	1545.33	3	271.13	A
T1	1470.97	3	271.13	A B
T5	1449.20	3	271.13	A B
T8	1248.00	3	271.13	A B C
T9	491.70	3	271.13	A B C
T3	335.00	3	271.13	A B C
T4	149.00	3	271.13	B C
T2	8.48	3	271.13	C

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

^a Concentración media de ADN expresada en ng/ μ L

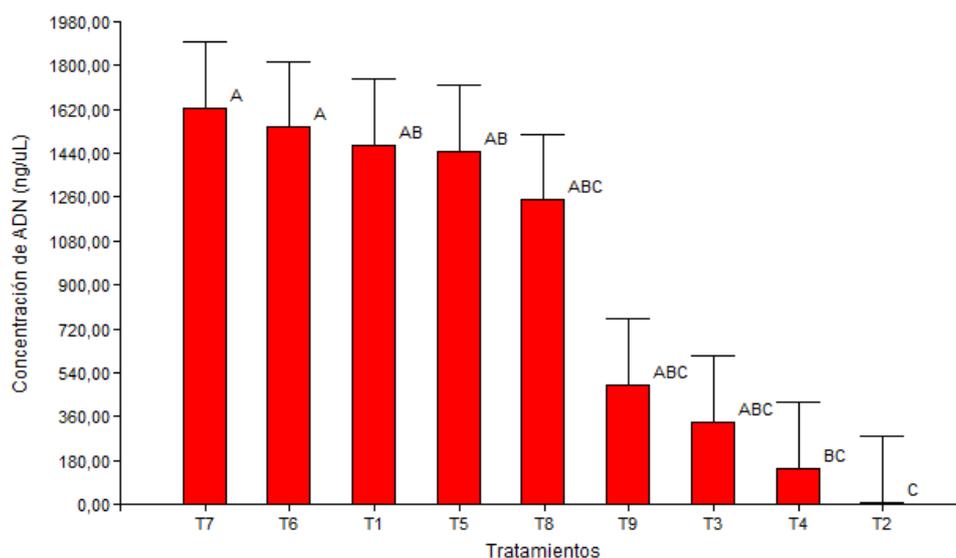


Figura 7. Concentración de ADN total en cada tratamiento. Las letras encima de las barras representan las medias de cada tratamiento, existiendo diferencias significativas con letras diferentes.

La electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para confirmar la integridad de los extractos de ADN del tratamiento T6 y T7 se puede observar en la Figura 8. Los valores de absorbancia a 280/260 nm en ambos tratamientos T6 y T7 indicaron una pureza óptima del ADN (entre 1.8-2.0). Los valores de absorbancia 260/230 nm mostraron contaminación por compuestos orgánicos en ambos tratamientos, probablemente por el compuesto CTAB empleado en la extracción de ADN.

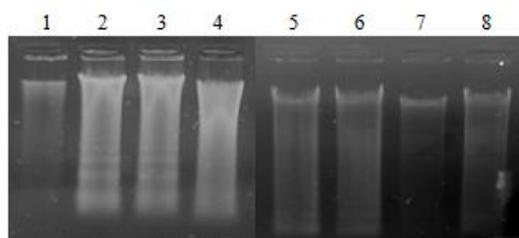


Figura 8. Electroforesis para visualizar integridad del ADN total de cogollo. Pocillos 1-4: Tratamiento mediante el protocolo de Wilson con trituración del cogollo en nitrógeno líquido (Tratamiento T7). Pocillos 5-8: Tratamiento mediante protocolo de Wilson con triturado manual del cogollo en mortero (Tratamiento T6).

De acuerdo a los resultados de concentración de ADN obtenidos junto con las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230 nm, se define el siguiente protocolo del tratamiento T6 (Tabla 4) para extraer ADN total del cogollo de palma aceitera: Se trituró en un mortero trozos de cogollo (~400mg) junto con 10 mL de buffer de extracción (2.5% CTAB de Invitrogen, 1.4M NaCl de Merck, 20 mM EDTA de J.T Backer y 100 mM Tris-HCl de Invitrogen) y 40 μ L de β -mercaptoetanol de Sigma. El tejido macerado se colocó en tubos falcon y se incubaron a baño de María a 60°C por 30 minutos, invirtiendo los tubos cinco veces cada 10 minutos. A continuación se añadió 10 mL de cloroformo frío (Merck), se homogenizó en vortex por 30 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Luego se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos y se transfirió 500 μ L de sobrenadante a tubos eppendorf de 1.5 mL, teniendo especial cuidado en no tocar la interfase. Se realizó una segunda centrifugación a 14500g por 5 minutos y se separó el sobrenadante en nuevos tubos eppendorf. Posteriormente se añadió 500 μ L de etanol absoluto frío (Fisher BioReagents) junto con 150 μ L de acetato de sodio 3M (Invitrogen) y 300 μ L de etanol al 70% y se dejó reposar durante 24 horas a -20°C. El precipitado se centrifugó a 14500 g por 17 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con 200 μ L de etanol al 70%, centrifugando

a 16500g por tres minutos entre cada lavado. A continuación se secaron los tubos con ayuda de una cámara de flujo laminar durante 30 a 45 minutos. Se resuspendió el pellet con 100 μ L de agua ultrapura libre de nucleasas (Invitrogen), se añadió 1 μ L de RNAsa (20 mg/mL PureLink™ RNase A) y se incubó en termobloque con agitación a 37°C por 15 minutos. Finalmente las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Con los extractos de ADN se realizó una valoración de los primers seleccionados (Tabla 5) mediante la técnica PCR, con la finalidad de comprobar que la amplificación fuese específica para los grupos de interés (hongos, bacterias, oomicetos). En la Figura 9 se puede observar la presencia de amplicones analizados en geles de agarosa al 1.2%. Para el gen 16S rRNA se obtuvo amplicones de ~1500 pb y para el gen ITS se obtuvo amplicones de ~670 pb. En el análisis de oomicetos no se obtuvo amplicones.

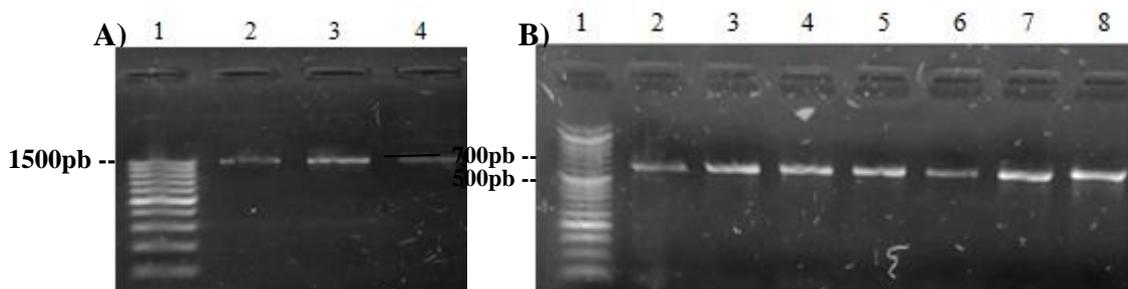


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para amplicones ADN total. **A)** Amplicones 16S ARNr. Pocillo 1: Marcador molecular GeneRuler 100bp Thermo Scientific. Pocillo 2: muestra sana (E0P1C). Pocillo 3: muestra en estadio 1 (E1P1C). Pocillo 4: muestra en estadio 2 (E2P1C). **B).** Amplicones ITS. Pocillo 1: Marcador molecular 100bp Plus Opti. Pocillos 2-3: muestras sanas (E0P1C-E0P2C). Pocillos 4-5: muestras en estadio 1 (E1P1C-E1P2C). Pocillos 6-7: muestras en estadio 2 (E2P1C-E2P2C). Pocillo 8: control positivo (*Fusarium solani*).

4.2. Calidad de los resultados de secuenciación para ITS y 16S ARNr

En las Tablas 12 y 13 se puede apreciar el número de secuencias obtenidas y los cambios en cada etapa del tratamiento con del plugin DADA2. Mediante el script *qiime dada2 denoise-paired* se eliminó secuencias de primers junto con el ruido de las secuencias de extremos emparejados y se filtró posibles quimeras.

Tabla 12. Número de secuencias en cada paso del pipeline del plugin DADA2 de QIIME 2 para el gen ITS.

Muestra	Input	Filtrado	Denoised	Merged	Non-chimeric
E0P1C	119394	104657	103973	102680	101311
E0P2C	157731	102584	97280	81817	75591
E0P3C	144454	120159	117555	109923	108528
E0P4C	152490	134526	133028	130495	127987
E0P5C	162583	84242	80635	70824	61603

E1P1C	80361	1584	1569	1312	1312
E1P2C	106210	56366	55652	52839	47279
E1P3C	155453	125366	124768	122022	105655
E1P4C	179752	146141	145295	138961	116585
E1P5C	145024	81389	80872	79034	72661

E2P1C	87482	13142	13103	11070	11052
E2P2C	97960	30995	30815	27817	22956
E2P3C	56604	14585	14391	12841	12125
E2P4C	10189	4161	3949	3310	3169
E2P5C	13557	5549	5385	3429	3429

Tabla 13. Número de secuencias en cada paso del pipeline del plugin DADA2 de QIIME 2 para el gen 16S ARNr.

Muestra	input	Filtrado	Denoised	Merged	Non-chimeric
E0P1C	187816	173770	172331	165681	162031
E0P2C	180500	167410	166749	165294	162049
E0P3C	172998	162294	160558	157911	156829
E0P4C	179429	168431	166692	163559	157599
E0P5C	159770	152058	149262	140746	125058

E1P1C	52068	25253	24278	21788	8084
E1P2C	25511	11273	11047	10642	3439
E1P3C	165355	154721	150241	139093	125535
E1P4C	182226	171110	162853	145987	126816
E1P5C	138565	130990	127599	116766	104915

E2P1C	48198	19006	18010	16258	6977
E2P2C	32690	15146	14432	12967	4643
E2P3C	164280	152961	151758	148208	143799
E2P4C	173306	162453	155374	141037	127739
E2P5C	163129	152241	143430	122354	111986

4.3. Análisis taxonómico de la comunidad fúngica

El análisis de secuenciación masiva del gen ITS generó 1669244 secuencias sin procesar con una longitud media de ~347 pb. Después del control de calidad y eliminación de quimeras se obtuvo 871243 secuencias correspondientes a 1789 secuencias únicas.

Los datos fueron normalizados por proporción previo al análisis de abundancias. En la Figura 10 se puede observar los principales filos de las comunidades fúngicas, donde Ascomycota fue el más abundante en los tres estadios, principalmente en las plantas sanas (89.30% en promedio) y en primer estadio de la PC (73.17% en promedio). En contraste con las muestras del segundo estadio, donde fueron más frecuentes los filos Ascomycota con 65.44% y Basidiomycota con 33.75% en promedio.

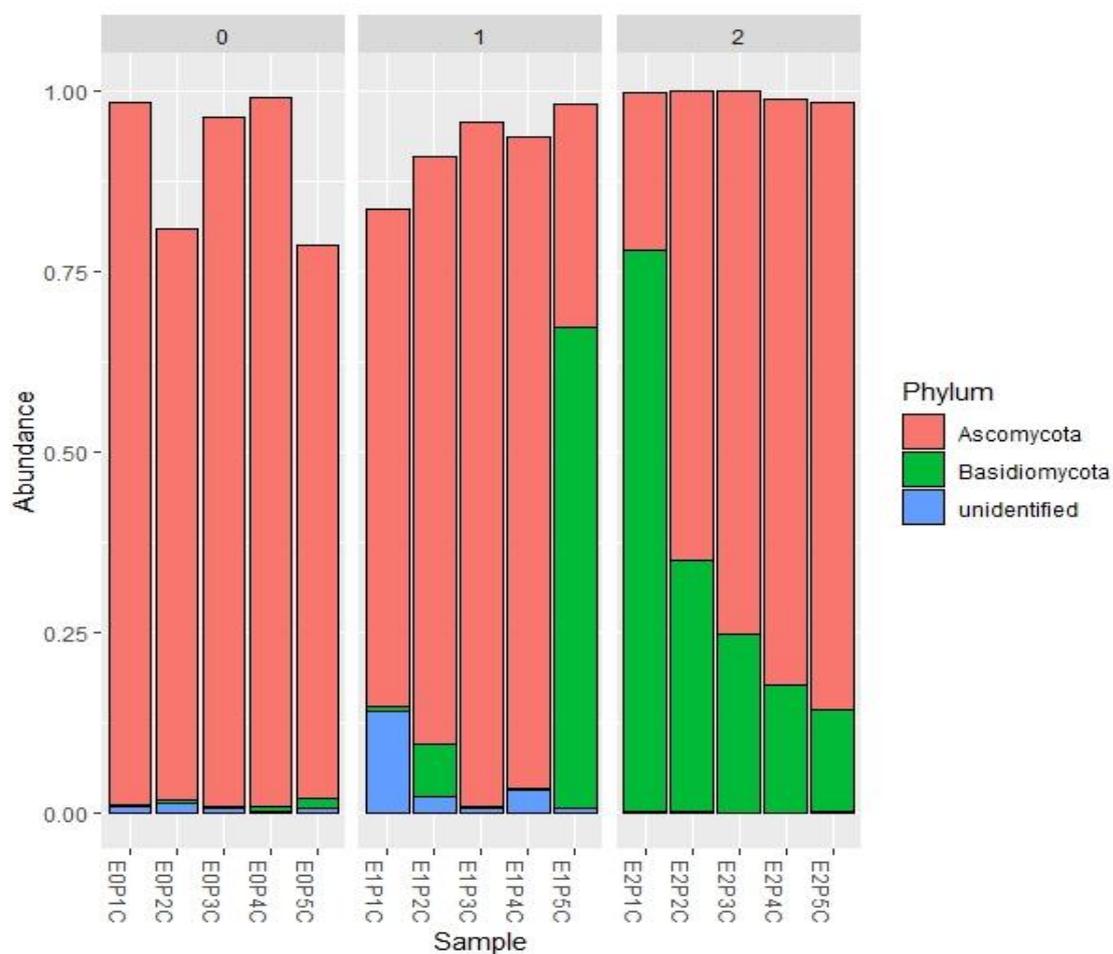


Figura 10. Composición de las comunidades fúngicas en muestras de cogollo a nivel de filo.

A nivel de familia (Figura 11) el grupo más abundante en plantas sanas (E0) fue Saccharomycetaceae con un 81.87% en promedio. En el primer estadio de PC (E1) el grupo más frecuente fue Nectriaceae con un 35.14% en promedio, mientras que en el segundo estadio (E2) fueron Didymellaceae con un 36.84%, Fomitopdidaceae con un 16.94% y Phaeosphaeriaceae con un 8.25%.

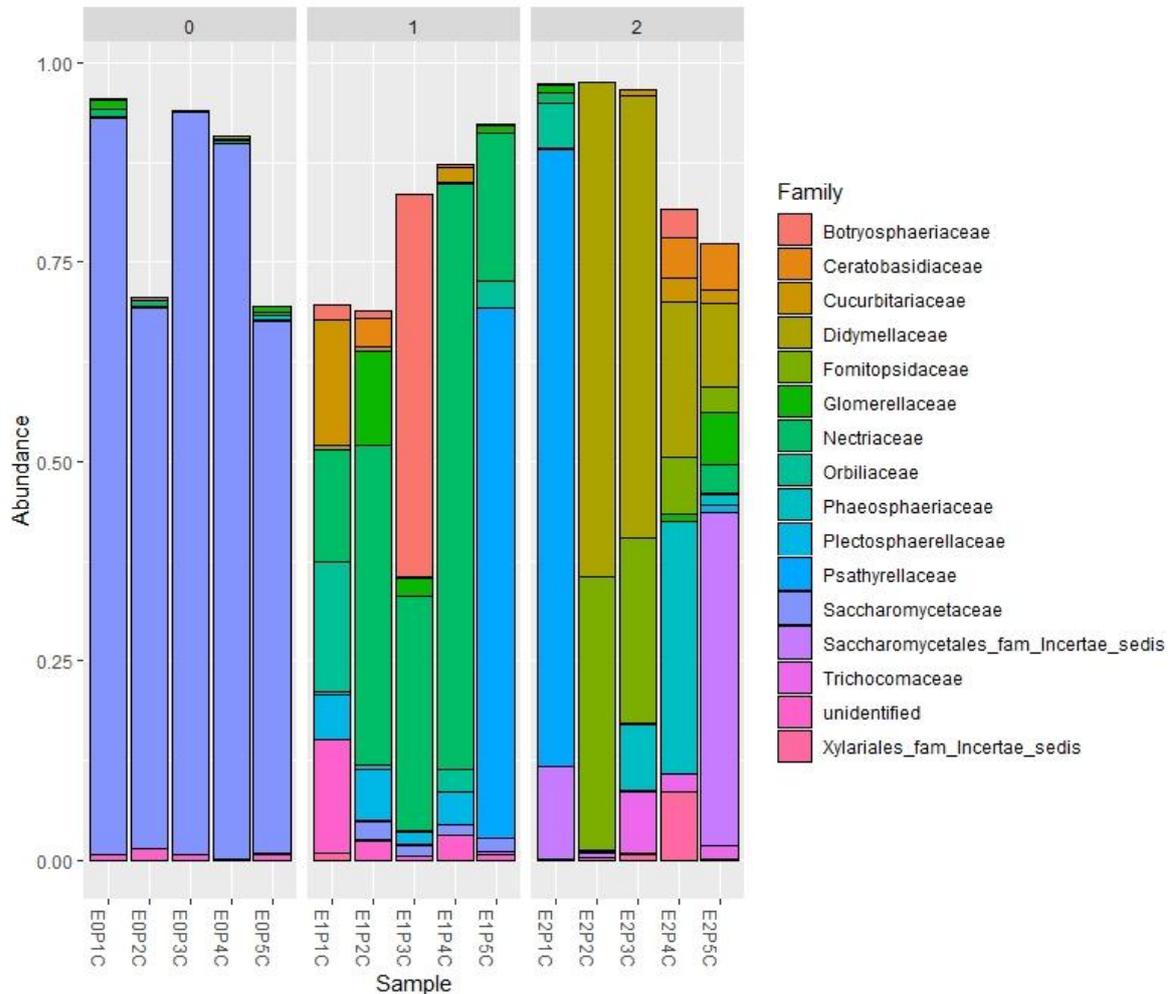


Figura 11. Composición de las comunidades fúngicas en muestras de cogollo a nivel de familia.

A nivel de género (Figura 12) el grupo más numeroso en plantas sanas (E0) fue *Kazachstania* con un 81.81% en promedio. En el primer estadio de PC (E1) fueron los géneros *Fusarium* con 20.73%, *Coprinopsis* con 16.75% y *Lasiodiplodia* con 10.18%, en menor porcentaje se encontraron a *Paracremonium* con 8.65% y *Arthrotrrys* con 4.5%.

En el segundo estadio de PC (E2) los géneros más abundantes en promedio fueron *Antrodia* con 13.55%, un género no identificado que pertenece a la familia Didymellaceae con un 26.69% y *Candida* con 10.82%.

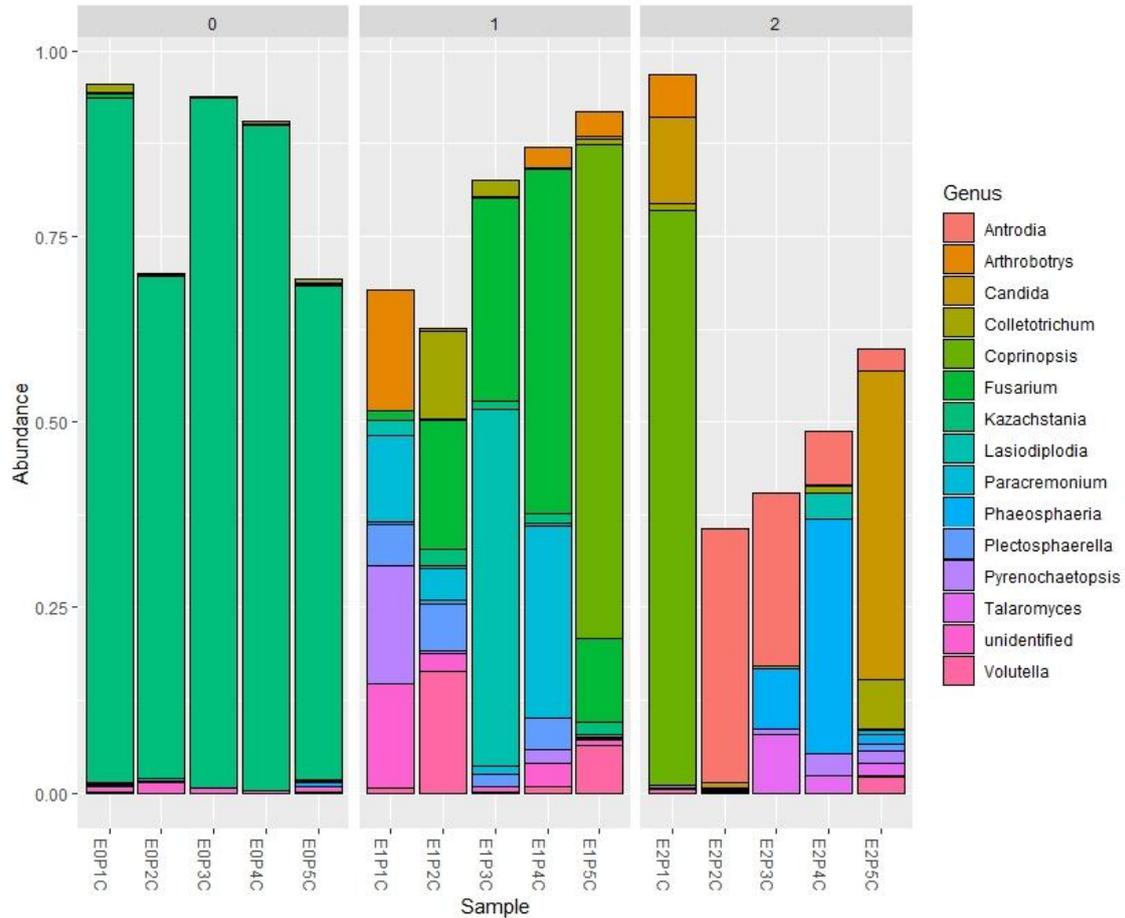


Figura 12. Composición de las comunidades fúngicas en muestras de cogollo a nivel de género.

En la Figura 13 se puede observar las proporciones de taxones a nivel de género mediante un mapa de calor. Una mayor proporción está representada por una menor intensidad del color (color amarillo). Además, se pudo observar que el género *Kazachstania* fue el más frecuente en plantas sanas y disminuyó con el progreso de la PC, mientras que el género *Fusarium* aumentó en el primer estadio de PC.

Para el análisis diferencial de ASV (variantes de secuencia amplificadas) se normalizaron los datos y analizó la abundancia diferencial con Deseq2 en R. En el

análisis los genes se ordenaron y se seleccionaron aquellos con un p -valor menor a 0.5, obteniéndose 1789 genes que se expresan diferencialmente entre sanas y enfermas.

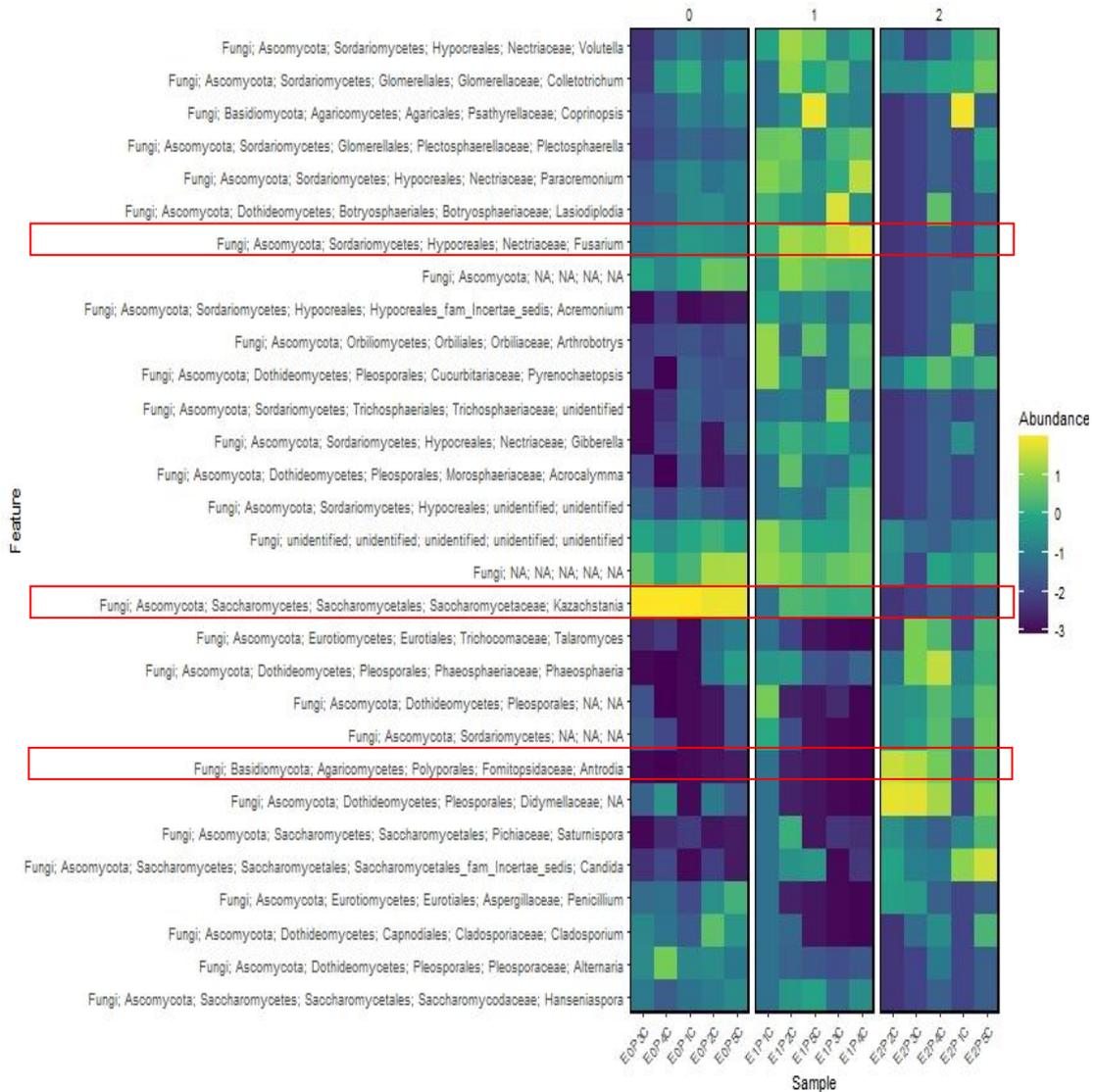


Figura 13. Mapa de calor de la abundancia relativa de secuencias de hongos a nivel de género. Los taxones más abundantes en las muestras presentaron una menor intensidad de color (cuadro rojo).

En la Figura 14 se observa la distribución de las secuencias ASV con abundancia diferencial entre plantas sanas y enfermas. Correspondiendo las secuencias ASV_644 y ASV_640 a la familia Didymellaceae, las secuencias ASV_102, ASV_20 y ASV_54 a hongos sin clasificación taxonómica y la secuencia ASV_785 al género *Kazachstania*. Además, se puede apreciar que las secuencias ASV_644, ASV_102, ASV_20, ASV_54

y ASV_785 están presentes solamente en plantas sanas y en consecuencia podrían ser consideradas como potenciales biocontroles para protección de la planta contra la PC.

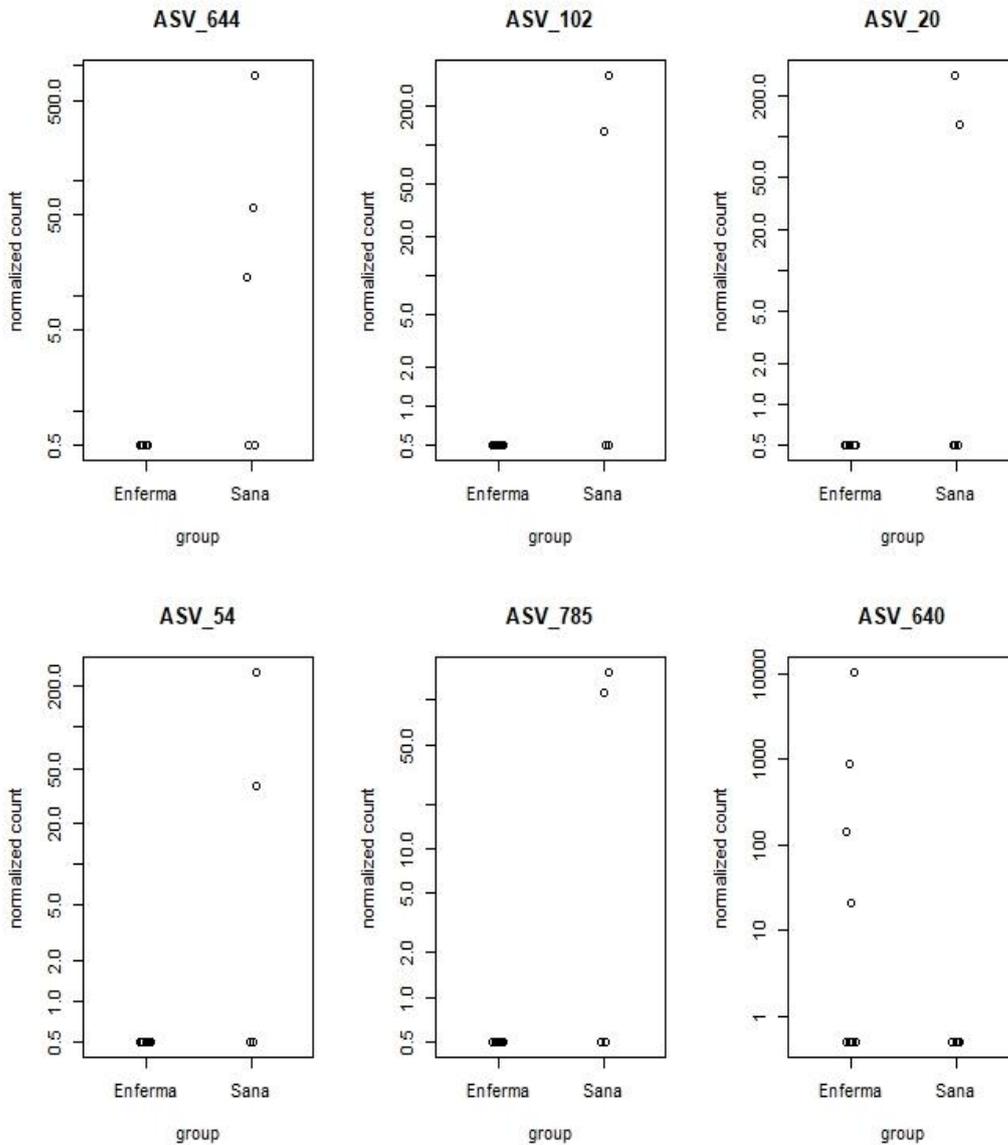


Figura 14. Conteos normalizados entre plantas sanas y enfermas para las ASV con abundancias diferenciales.

4.3.1. Análisis de biodiversidad alfa

El análisis de diversidad alfa se realizó con la finalidad de conocer la riqueza de especies presentes en las muestras. Para la medición de la riqueza de especies se realizaron análisis de los índices Observed, Shannon, Simpson e Inverso de Simpson,

los cuales presentaron una buena diversidad de especies fúngicas en las muestras sanas y en cada estadio de PC (Figura 15).

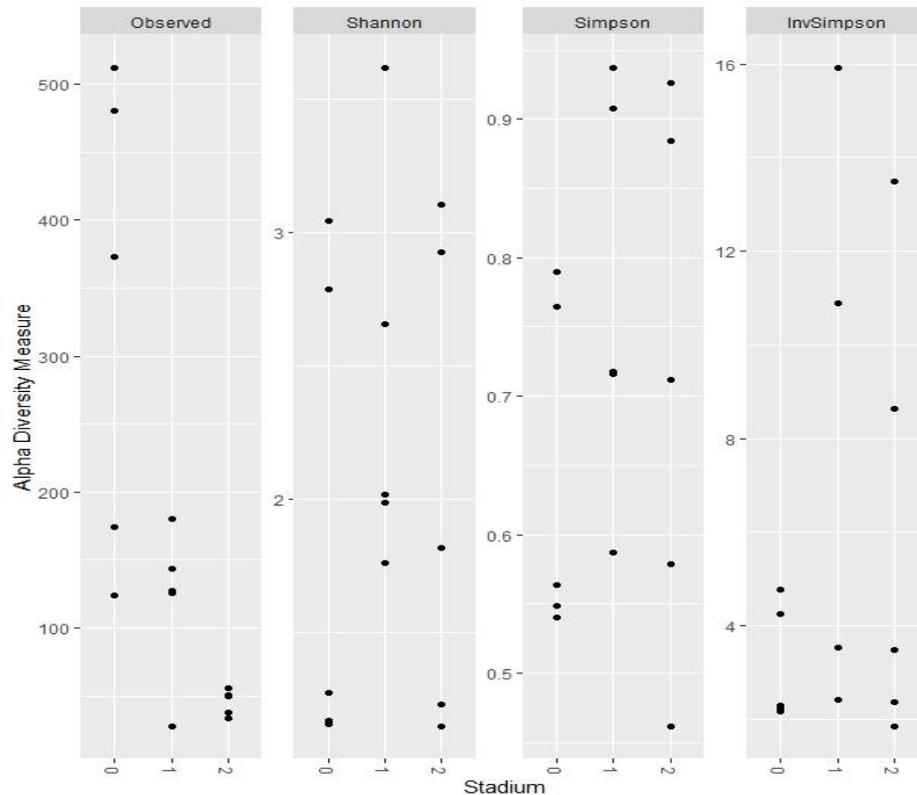


Figura 15. Índices de biodiversidad fúngica analizada en muestras de cogollo en cada estadio de PC.

La medida ‘Observed’ representa la cantidad de taxones observados en cada muestra, resultando mayor en plantas sanas. Para el índice de Shannon los valores estuvieron en el rango de 1 a 4, considerándose valores inferiores a 2 como bajos en biodiversidad y mayor a 3 como altos en biodiversidad. Además, se pudo observar una mayor diversidad de especies en el primer estadio de la PC (Tabla 14).

En el índice de Simpson las muestras más cercanas a “1” indicaron una mayor dominancia de una especie y las muestras más cercanas a “0” una mayor biodiversidad. Mientras que el índice inverso de Simpson reveló que en la mayoría de las muestras hubo una mayor riqueza, pues a un mayor valor del índice hay una mayor diversidad de especies (Tabla 14).

Tabla 14. Diversidad de especies fúngicas en las muestras analizadas por NGS.

	Taxones observados	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Índice Inverso Simpson
E0P1C	124	1.68	0.54	2.18
E0P2C	512	3.04	0.79	4.76
E0P3C	373	1.27	0.55	2.21
E0P4C	174	1.15	0.56	2.29
E0P5C	480	2.78	0.76	4.25
E1P1C	28	2.65	0.91	10.88
E1P2C	180	3.61	0.94	15.91
E1P3C	144	1.98	0.72	3.54
E1P4C	126	2.01	0.72	3.54
E1F5C	127	1.76	0.59	2.42
E2P1C	38	1.14	0.46	1.85
E2P2C	34	1.22	0.58	2.37
E2P3C	50	1.81	0.71	3.47
E2P4C	56	3.10	0.93	13.49
E2F5C	51	2.92	0.88	8.63

A partir del paquete Metacoder en R [151] se analizó y manipuló los datos taxonómicos para obtener árboles de calor (Figura 16) que representan cuantitativamente las estadísticas de cada taxón mediante la utilización de color y tamaños de nodos.

Los taxones marrones indicaron un enriquecimiento en los tejidos sanos y los taxones celeste a tejidos enfermos. Los nodos del árbol, donde cada nodo desde el centro (reino) hasta el exterior (familia) representa diferentes niveles taxonómicos, presentaron un tamaño proporcional al conteo de ASVs en muestras sanas y enfermas. Se observó una mayor abundancia de los filos Ascomycota en las muestras sanas y Basidiomycota en las muestras enfermas.

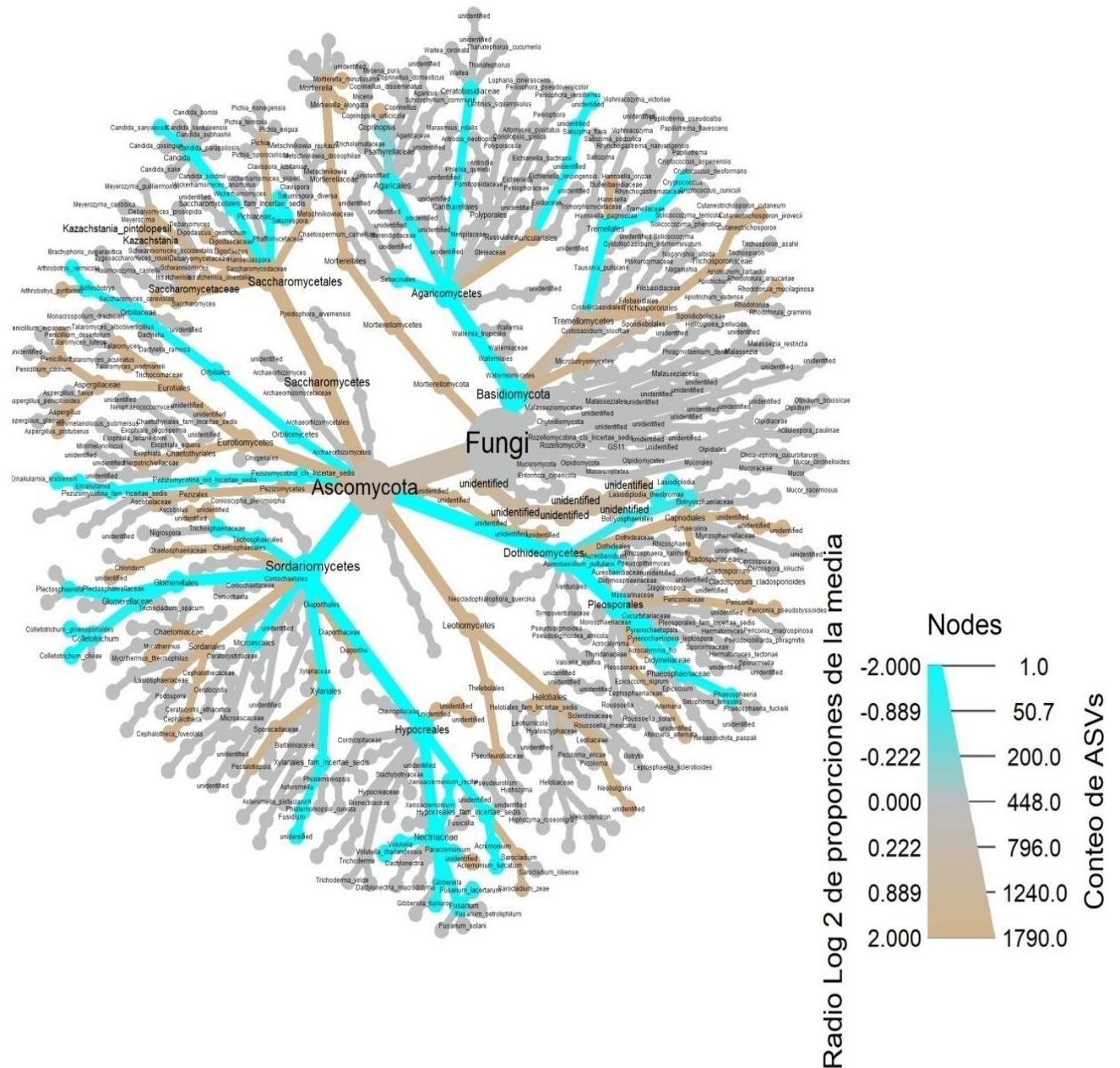


Figura 16. Árbol de calor diferencial que representa el cambio en la abundancia de taxones fúngicos entre plantas sanas y enfermas.

4.3.2. Análisis de biodiversidad beta

La diversidad beta se realizó para comparar la variedad de especies entre cada estadio de la PC así como la diversidad entre plantas sanas y enfermas. Al comparar las comunidades fúngicas, entre plantas sanas con enfermas y entre cada estadio, mediante el cálculo de la matriz de disimilitud de Bray-Curtis se pudo observar variabilidad en el

conjunto de datos. El índice de Bray-Curtis se caracteriza por realizar comparaciones a partir de las abundancias de especies, como se puede observar en la Figura 17 donde los objetos (puntos) ordenados juntos son más similares que los ordenados más lejos, teniendo cada eje su propio valor que representa la cantidad de variación capturada.

La ordenación PCoA reveló una separación de las muestras de plantas sanas (E0) y enfermas (E1 y E2), indicando que la comunidad fúngica de cada estadio de PC (E1 y E2) es distinta al de las muestras sanas (E0). Se pudo distinguir que las muestras en el primer y segundo estadio de PC se agruparon en el componente principal 1 (Axis 1), el cual presentó una mayor cantidad de variación correspondiente a 30.18%

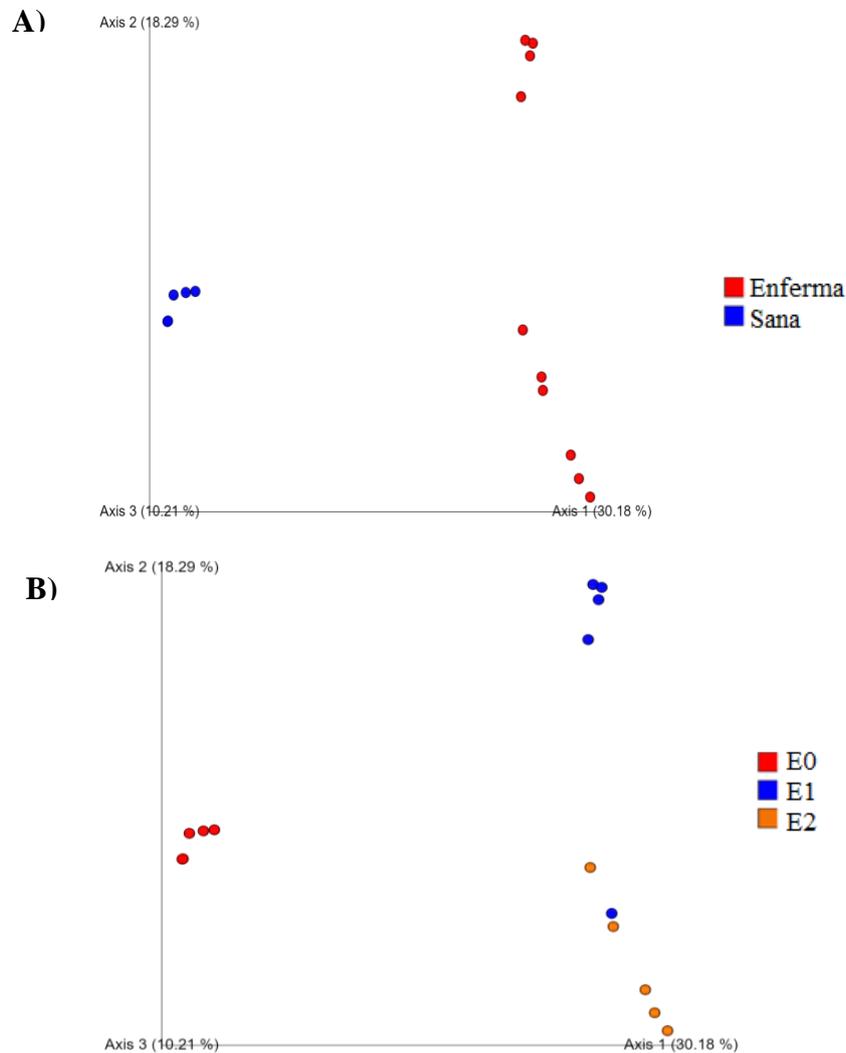


Figura 17. PCoA calculado utilizando medidas de Bray-Curtis para el gen ITS. La distancia entre los puntos indica el grado de diferencia entre las variables: A) Sanas y enfermas y B) Estadios de la PC (E1 y E2) y sanas (E0).

También se evaluó el índice Jaccard cuya medida de similitud no considera la filogenia al igual que Bray-Curtis y que realiza comparaciones a partir de la ausencia o presencia de especies (Figura 18). Las muestras formaron agrupaciones indicando una diversidad fúngica similar en cada uno de los estadios con una mayor cantidad de variación (21.29%) en el componente principal 1 (Axis 1).

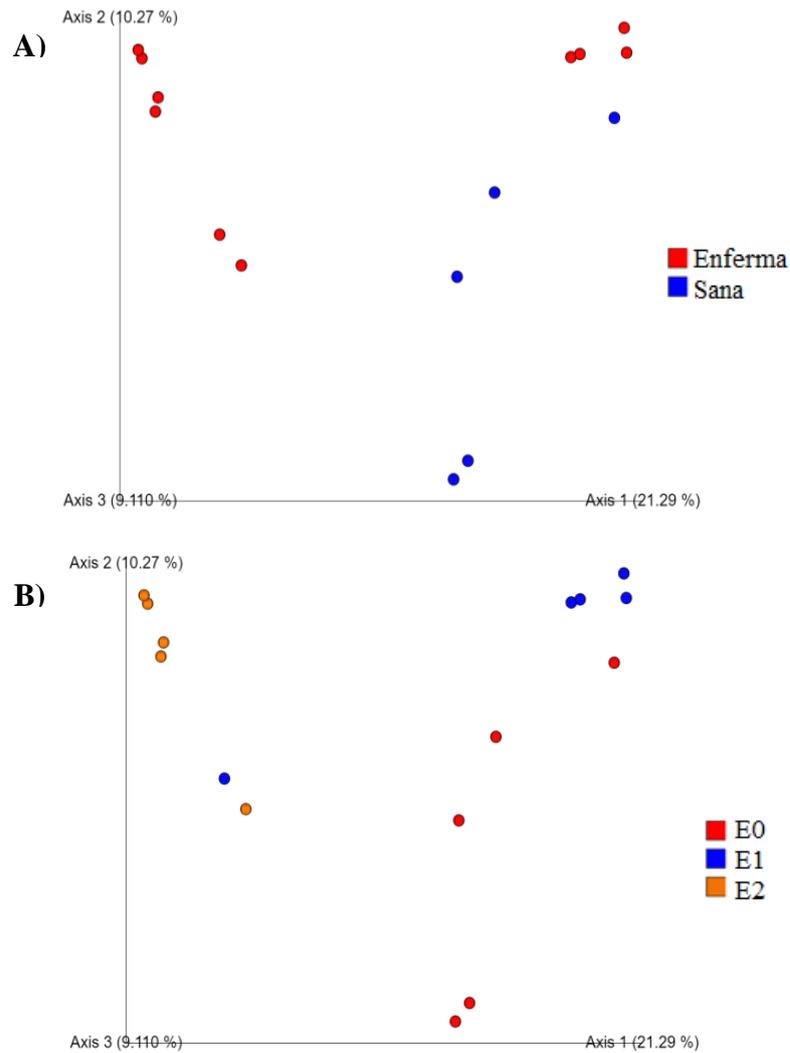


Figura 18. PCoA calculado utilizando medidas de Jaccard para el gen ITS. La distancia entre los puntos indica el grado de diferencia entre las variables: A) Sanas y enfermas y B) Estadios de la PC (E1 y E2) y sanas (E0).

También se comparó las comunidades microbianas mediante otra métrica de distancia Unifrac que considera a las distancias filogenéticas entre los microorganismos observados en el cálculo. Se empleó la prueba Unifrac no ponderada (Unweighted

Unifrac) que considera la presencia o ausencia de microorganismos observados (Figura 19) y Unifrac ponderada (Weighted Unifrac) que considera la abundancia de los microorganismos (Figura 20).

El componente principal 1 (Axis 1) de la prueba Unifrac ponderada presentó una mayor cantidad de variación correspondiente a 47.87%, agrupándose en este eje la mayoría de las muestras del primer y segundo estadio de la PC.

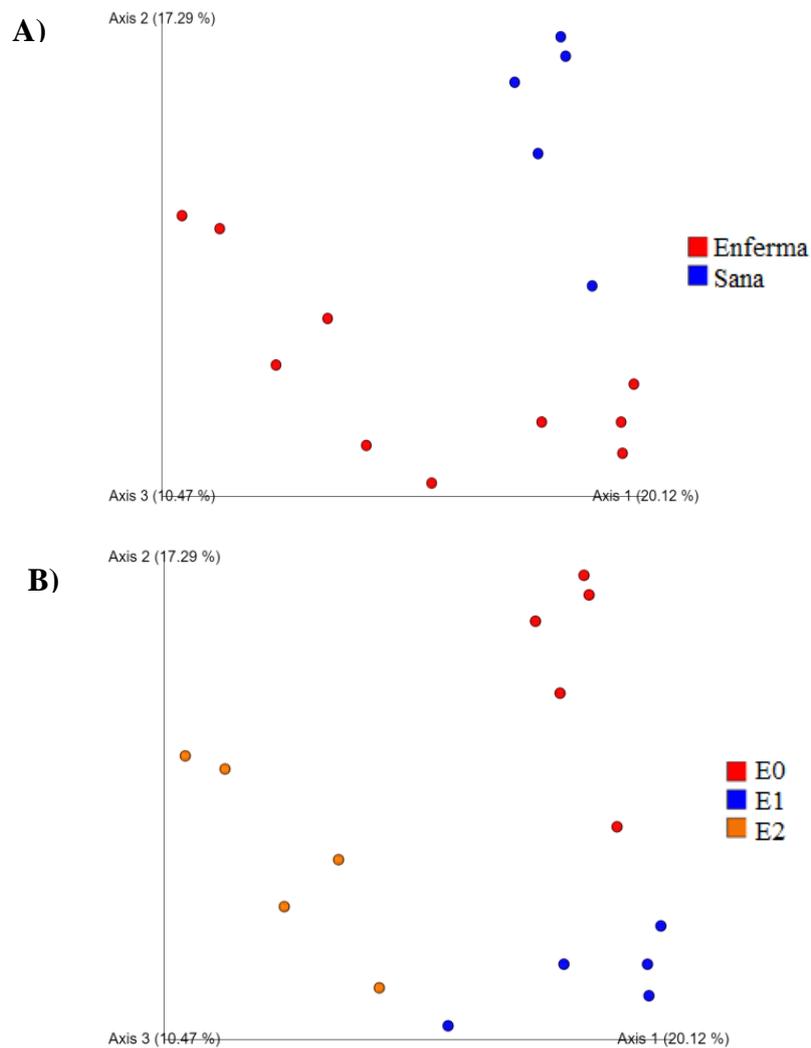


Figura 19. PCoA calculado utilizando medidas de Unweighted Unifrac para el gen ITS. La distancia entre los puntos indica el grado de diferencia entre las variables: A) Sanas y enfermas y B) Estadios de la PC (E1 y E2) y sanas (E0).

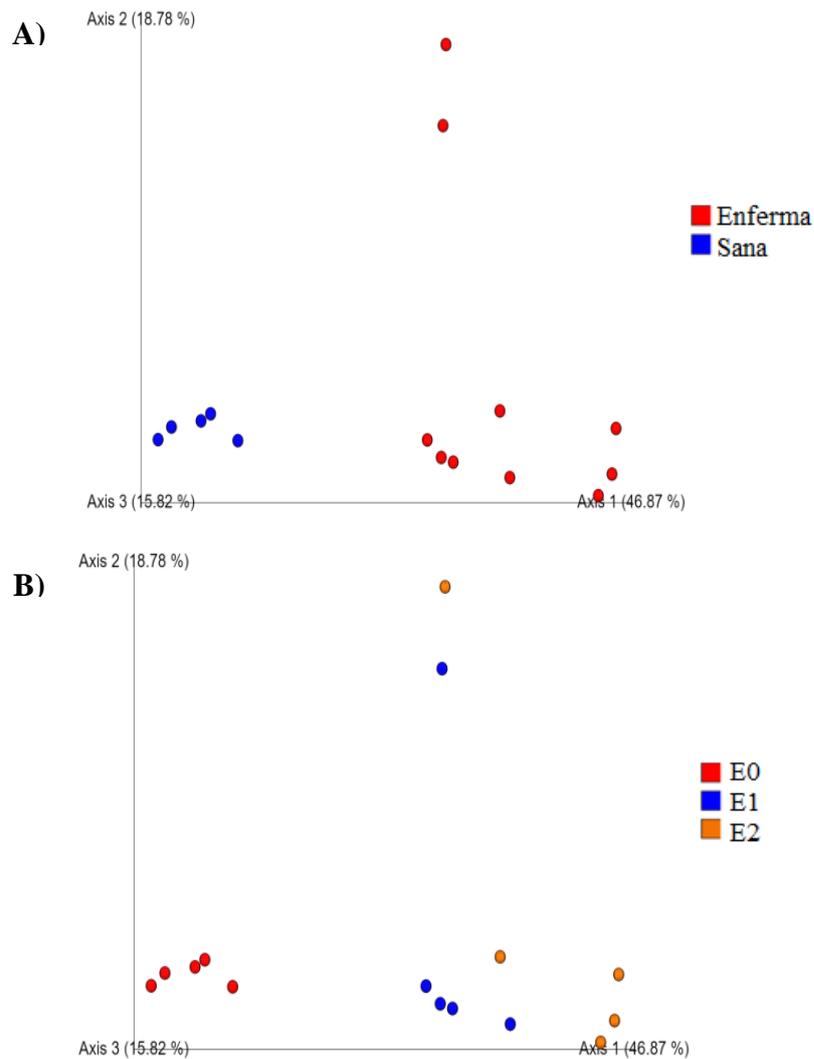


Figura 20. PCoA calculado utilizando medidas de Weighted Unifrac para el gen ITS. La distancia entre los puntos indica el grado de diferencia entre las variables: A) Sanas y enfermas y B) Estadios de la PC (E1 y E2) y sanas (E0).

Al realizar el análisis de varianza multivariante permutacional (Permanova) con 10000 permutaciones entre la diversidad fúngica de cada estadio se obtuvo que existen diferencias significativas en las comunidades de cada estadio (Tabla 15).

Tabla 15. Prueba de permutación de dispersiones multivariadas para hongos.

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)	
Stadium	2	1.7940	0.5983	8.9374	0.00009999	***
Residual	12	1.2044	0.4016			
Total	14	2.9983	1.0000			

Significado códigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

4.4. Análisis taxonómico de la comunidad bacteriana

El análisis de secuenciación masiva del gen 16s ARNr generó 2025841 secuencias sin procesar con longitud promedio de ~419 pb. Después del control de calidad y eliminación de quimeras quedaron 1527499 secuencias correspondientes a 7361 secuencias únicas. Finalmente, después de la eliminación de secuencias de cloroplastos y mitocondrias se obtuvo 408663 secuencias correspondientes a 7087 secuencias únicas.

Para el análisis de abundancias relativas los datos se normalizaron mediante proporción. En la Figura 21 se puede observar una mayor presencia de los filo Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria tanto en plantas sanas como enfermas con PC. En plantas sanas el filo Proteobacteria estuvo presente con un 32.12% en promedio, Firmicutes con un 40.34% en promedio, Bacteroidetes con un 7.4% en promedio y Actinobacteria con un 8.2% en promedio. En el primer estadio de PC los filos más abundantes fueron Proteobacteria con un 43.25% en promedio, Firmicutes con un 37.41% en promedio, Bacteroidetes con un 20.93% en promedio y Actinobacteria con un 3.15% en promedio. En el segundo estadio de PC el filo Proteobacteria estuvo presente en un 50.31% en promedio, Firmicutes con un 10.72% en promedio, Bacteroidetes con un 29.12% en promedio y Actinobacteria con un 5.25% en promedio.

A nivel de familia (Figura 22) se pudo observar un mayor porcentaje del grupo Paenibacillaceae en plantas sanas con un 31.97% en promedio (18.33% en E0P1C, 1.27% en E0P2C, 25.90% en E0P3C y 82.37% en E0P4C). En el primer estadio de PC (E1) fueron más representativos los grupos Enterobacteriaceae con un 19.82% en promedio (5.50% en E1P1C, 60.50% en E1P2C, 19.84% en E1P3C, 12.10% en E1P4C y 1.14% en E1P5C) y de Lachnospiraceae con un 13.68% en promedio (16.75% en E1P1C, 12.93% en E1P3C, 14.44% en E1P4C y 10.60% en E1P5C). En el segundo estadio de PC (E2) fueron Enterobacteriaceae con un 10.86% en promedio (3.86% en E2P1C, 11.55% en E2P2C, 14.75% en E2P3C, 19.76% en E2P4C y 4.403% en E2P5C) y Bacteroidaceae con un 10.89% en promedio (2.71% en E2P1C, 4.83% en E2P2C, 26.39% en E2P3C, 9.30% en E2P4C y 11.24% en E2P5C).

A nivel de género (Figura 23) las plantas sanas (E0) presentaron un mayor porcentaje de *Paenibacillus* con un 31.75% en promedio (18.33% en E0P1C, 0.79% en E0P2C, 25.58% en E0P3C y 82.28% en E0P4C). En contraste con el primer estadio (E1) donde una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae sin clasificación de género fue más abundante con un 17.13%. En el segundo estadio (E2) los géneros con mayor frecuencia fueron *Bacteroides* con un 10.88% en promedio (2.71% en E2P1C, 4.83% en E2P2C, 26.39% en E2P3C, 9.28% en E2P4C y 11.24% en E2P5C) y la misma bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae sin clasificación de género del primer estadio con un 7.08% en promedio (2.32% en E2P1C, 8.89% en E2P2C, 4.02% en E2P3C, 17.89% en E2P4C y 2.27% en E2P5C).

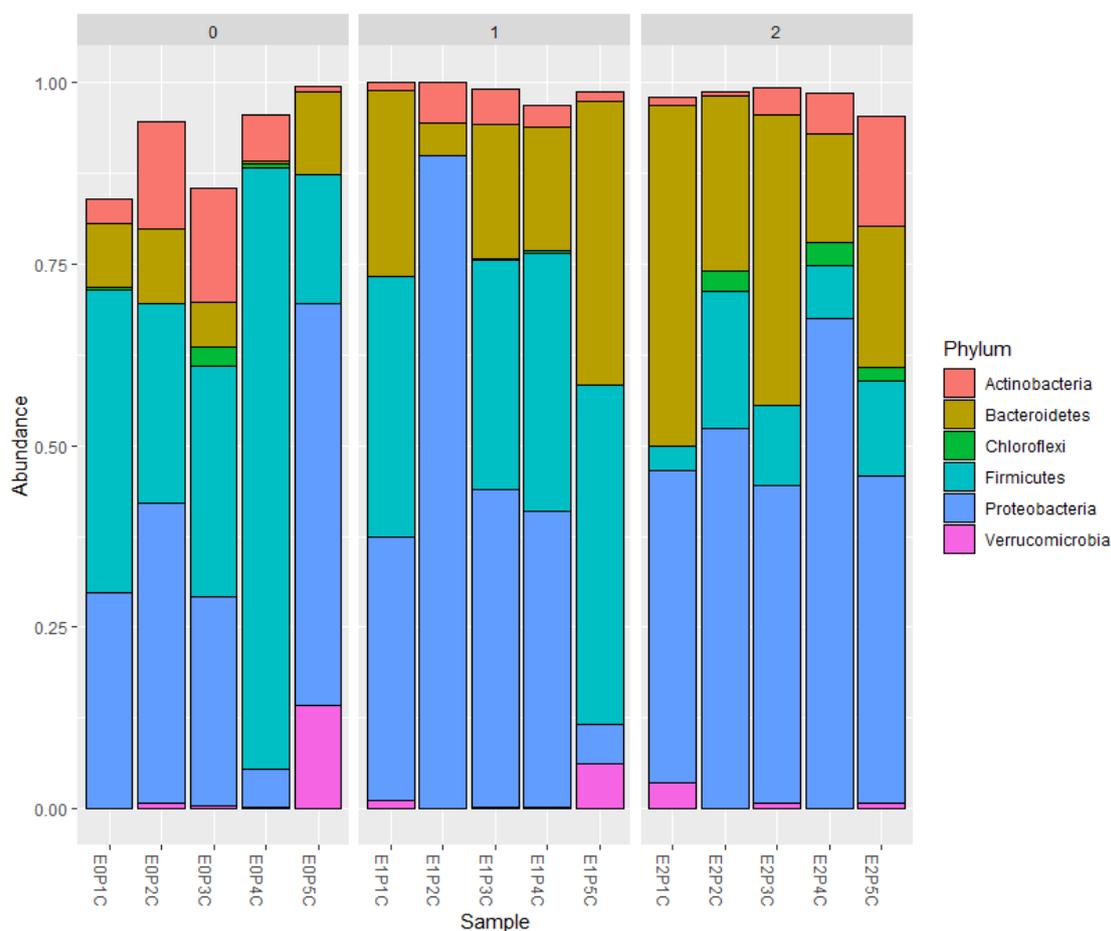


Figura 21. Composición de las comunidades bacterianas en muestras de cogollo a nivel de filo.

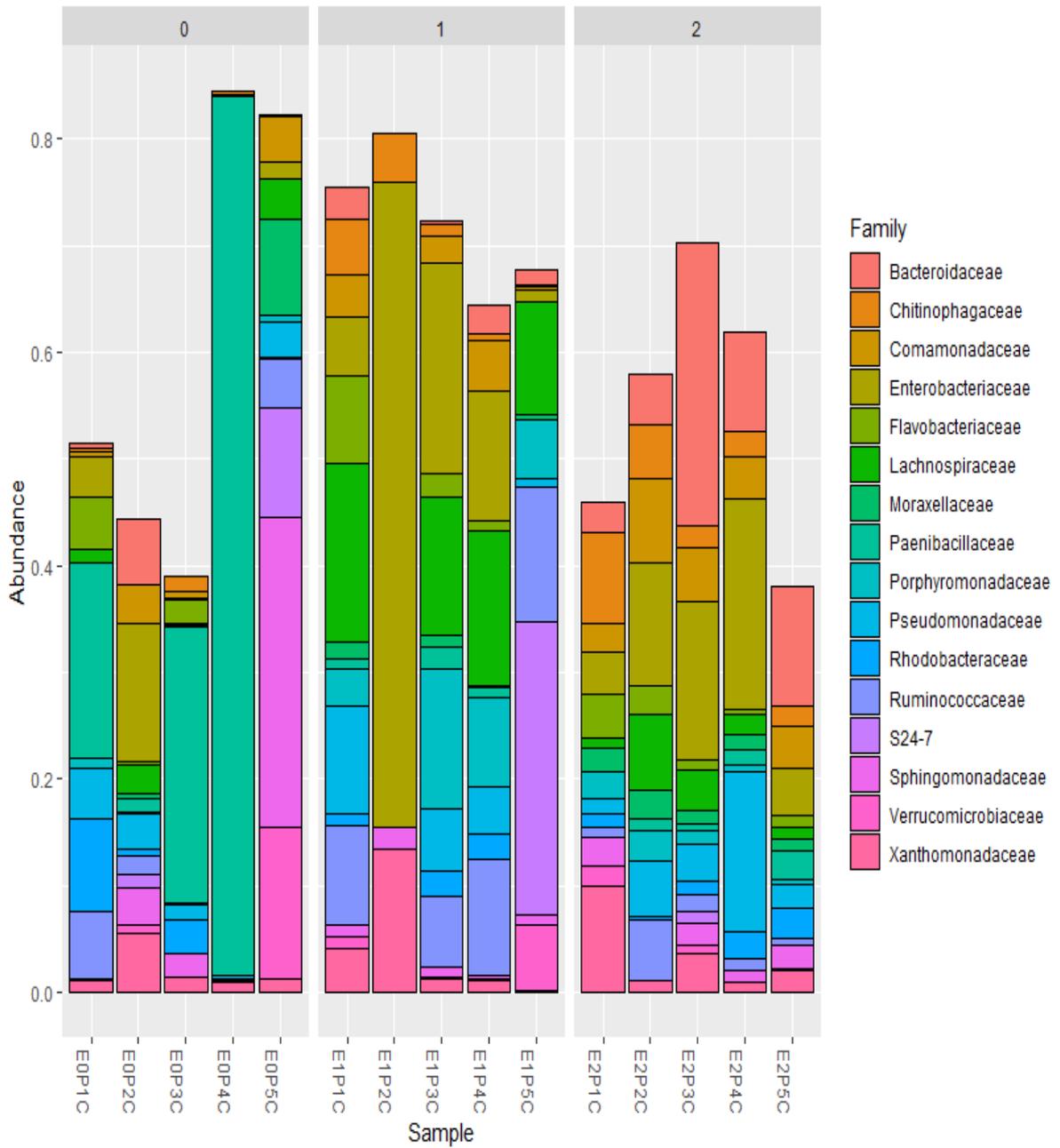


Figura 22. Composición de las comunidades bacterianas en muestras de cogollo a nivel de familia.

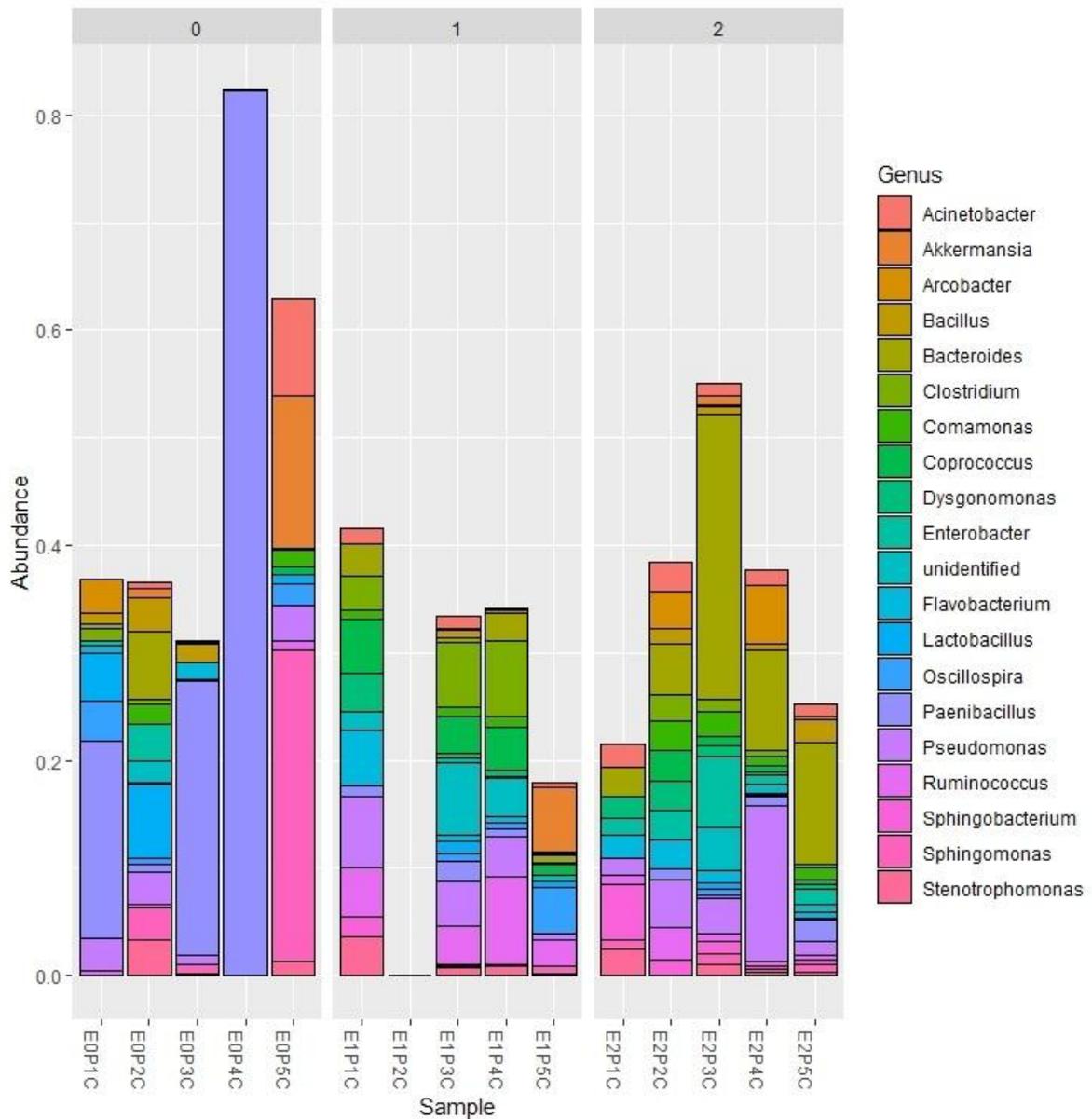


Figura 23. Composición de las comunidades bacterianas en muestras de cogollo a nivel de género.

En la Figura 24 se muestra un mapa de calor con las proporciones de taxones a nivel de géneros bacterianos, cuyo aumento se puede observar como una menor intensidad en color (color amarillo). Además, se pudo observar un aumento de ciertos géneros bacterianos conforme se desarrolló la enfermedad, tal es el caso de los géneros *Enterobacter*, *Bacteroides* y un taxón perteneciente a la familia Enterobacteriaceae sin clasificación de género. Solamente en las muestras de plantas sanas se pudo observar que el género *Paenibacillus* disminuyó conforme se desarrolló la PC.

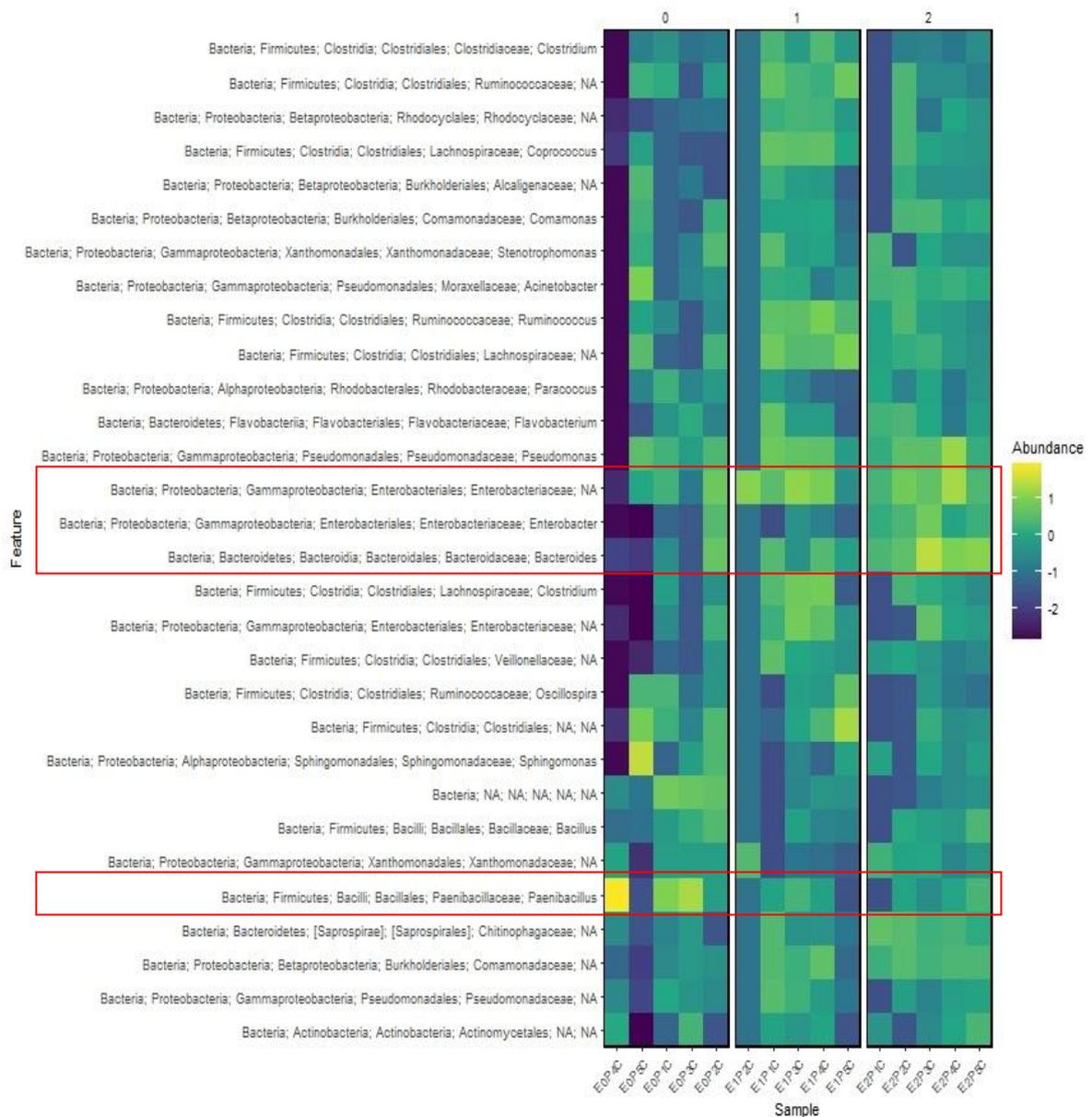


Figura 24. Mapa de calor de la abundancia relativa de secuencias de bacterias a nivel de género. Los taxones más abundantes en las muestras presentaron una menor intensidad de color (cuadro rojo).

Para el análisis diferencial de ASV se normalizó los datos y se analizaron mediante la librería Deseq2 de R. En la Figura 25 se puede observar la distribución de las secuencias ASV con mayor abundancia diferencial entre plantas sanas y enfermas. Las secuencias ASV_6007 y ASV_6022 correspondieron a la familia Enterobacteriaceae, ASV_4018 al género *Coprococcus*, ASV_3181 a la bacteria ABS-6, ASV_4397 al género *Ruminococcus* y ASV_3685 a bacterias del orden Acidimicrobiales. Además, se puede apreciar que las secuencias bacterianas ASV_3181 y ASV_3685 estuvieron presentes

solamente en plantas sanas y por esa razón podrían ser consideradas como potenciales biocontroles para protección de la planta contra la PC.

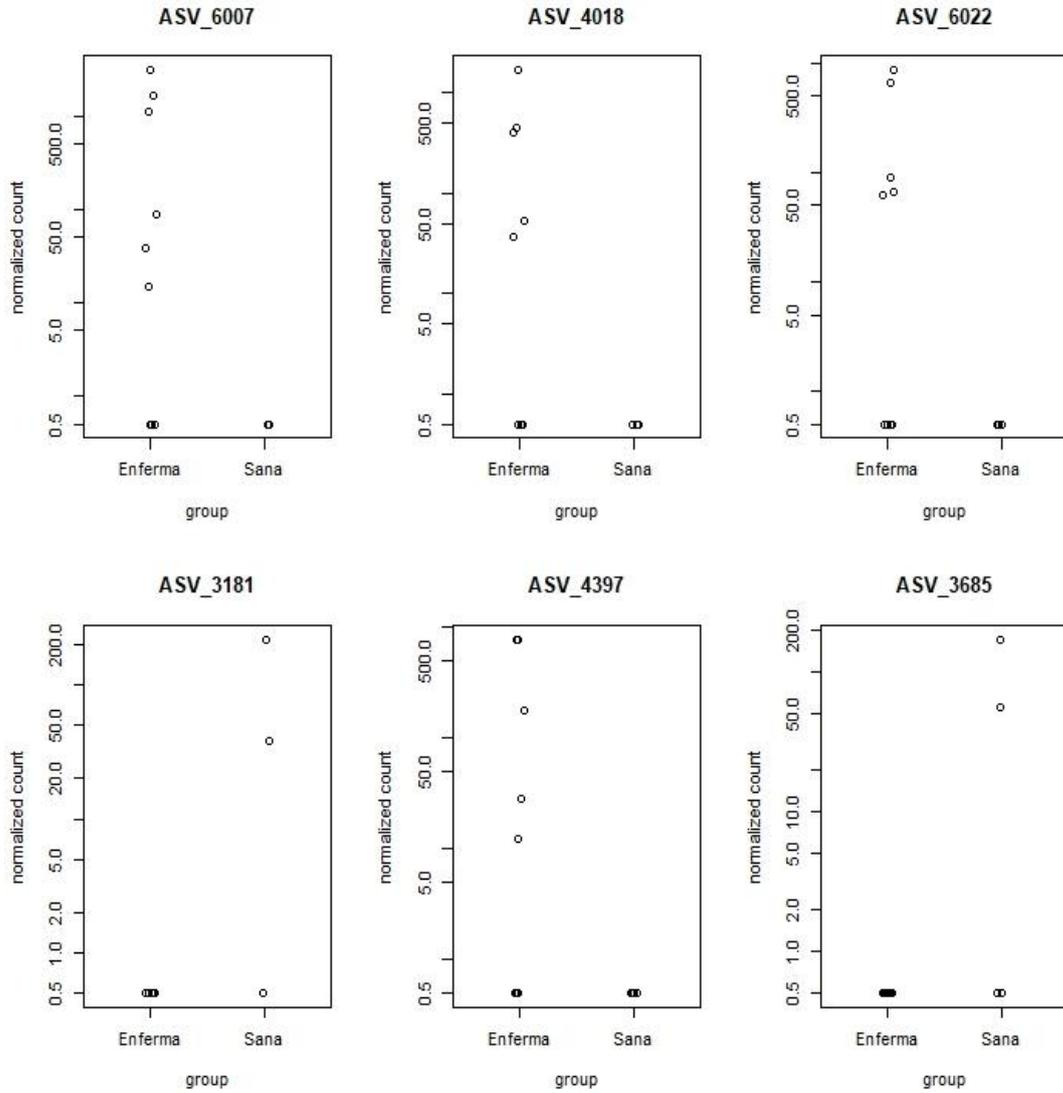


Figura 25. Conteos normalizados entre plantas sanas y enfermas para las ASV bacterianas más abundantes.

4.4.1. Análisis de biodiversidad alfa

La medición de riqueza de especies bacterianas presentes en cada muestra se realizó a partir de los índices Observed, Shannon, Simpson e Inverso de Simpson (Figura 26), cuyos análisis indicaron una buena diversidad de especies bacterianas en las muestras.

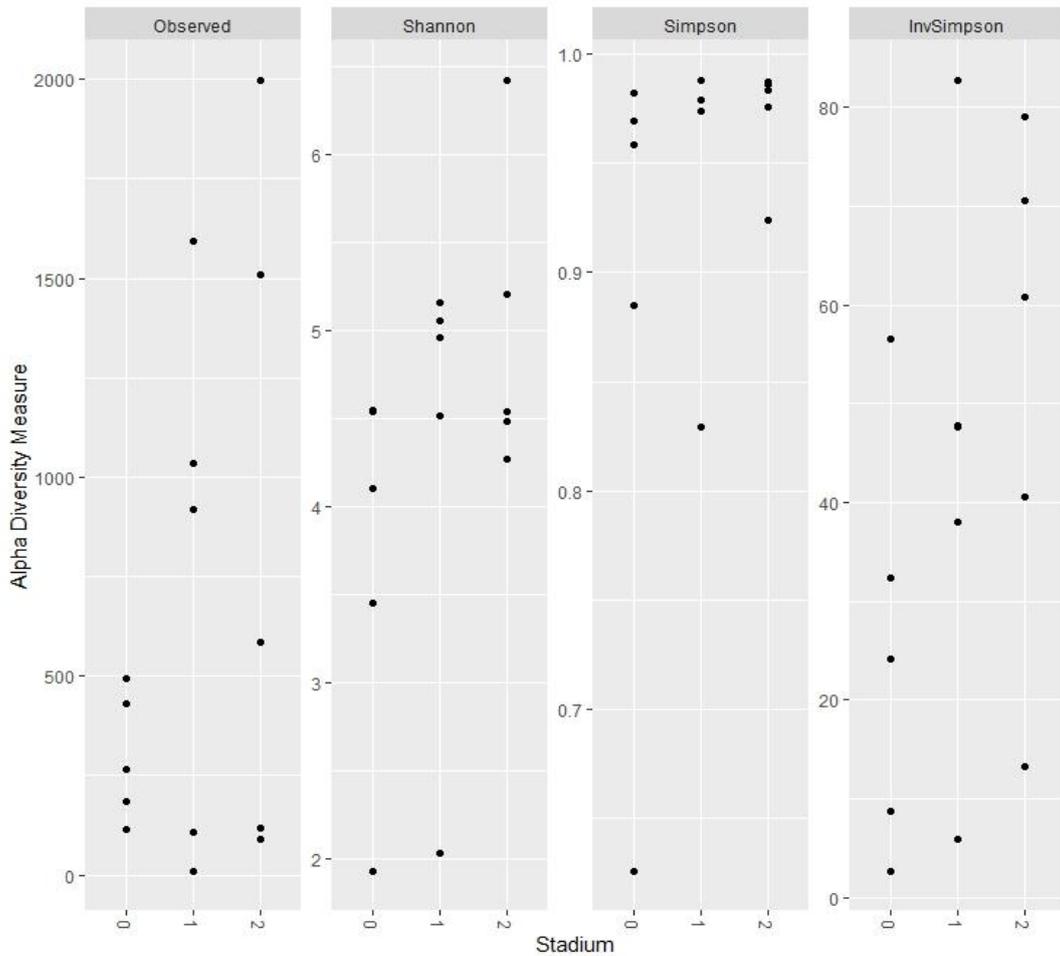


Figura 26. Índices de biodiversidad bacteriana analizados en las muestras de cogollo en cada estadio de PC.

El índice Observed indicó una mayor cantidad de taxones observados en las muestras del primer y segundo estadio de PC. Los valores del índice Shannon estuvieron en el rango de 1 a 6, teniendo una mayor biodiversidad las muestras con valores mayores a 2, como se puede observar en todas las muestras del segundo estadio. El índice de Simpson indicó que hay una mayor posibilidad de dominancia de una especie al tener valores más cercanos a “1”. El índice Inverso de Simpson mostró que las muestras del segundo estadio tuvieron una mayor riqueza de especies bacterianas (Tabla 16).

Tabla 16. Diversidad de especies bacterianas en las muestras analizadas por NGS.

	Taxones observados	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Índice Inverso Simpson
E0P1C	113	4.11	0.96	32.31
E0P2C	183	4.54	0.98	56.57
E0P3C	267	4.54	0.95	24.17
E0P4C	429	1.93	0.62	2.67
E0P5C	495	3.45	0.88	8.67
E1P1C	108	4.52	0.98	82.77
E1P2C	10	2.03	0.82	5.86
E1P3C	917	5.06	0.97	38.06
E1P4C	1592	5.16	0.97	47.68
E1F5C	1034	4.96	0.97	47.77
E2P1C	117	4.53	0.98	79.13
E2P2C	91	4.27	0.98	60.83
E2P3C	586	4.48	0.2	13.18
E2P4C	1509	5.21	0.97	40.53
E2F5C	1998	6.42	0.98	70.56

En el árbol de calor (Figura 27) obtenido con el paquete Metacoder en R [151], se observó la composición bacteriana entre plantas sanas y enfermas representada por un mapa ponderado y codificado por colores de acuerdo al número de lecturas, asignando el color marrón a muestras sanas y el color celeste a muestras con PC. Además, cada nodo presentó un tamaño proporcional de ASVs para cada nivel taxonómico.

En el árbol de calor se observó una mayor abundancia de los filos Proteobacteria y Bacteroidetes en plantas enfermas, a diferencia de las plantas sanas que presentaron grupos significativos como Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria.

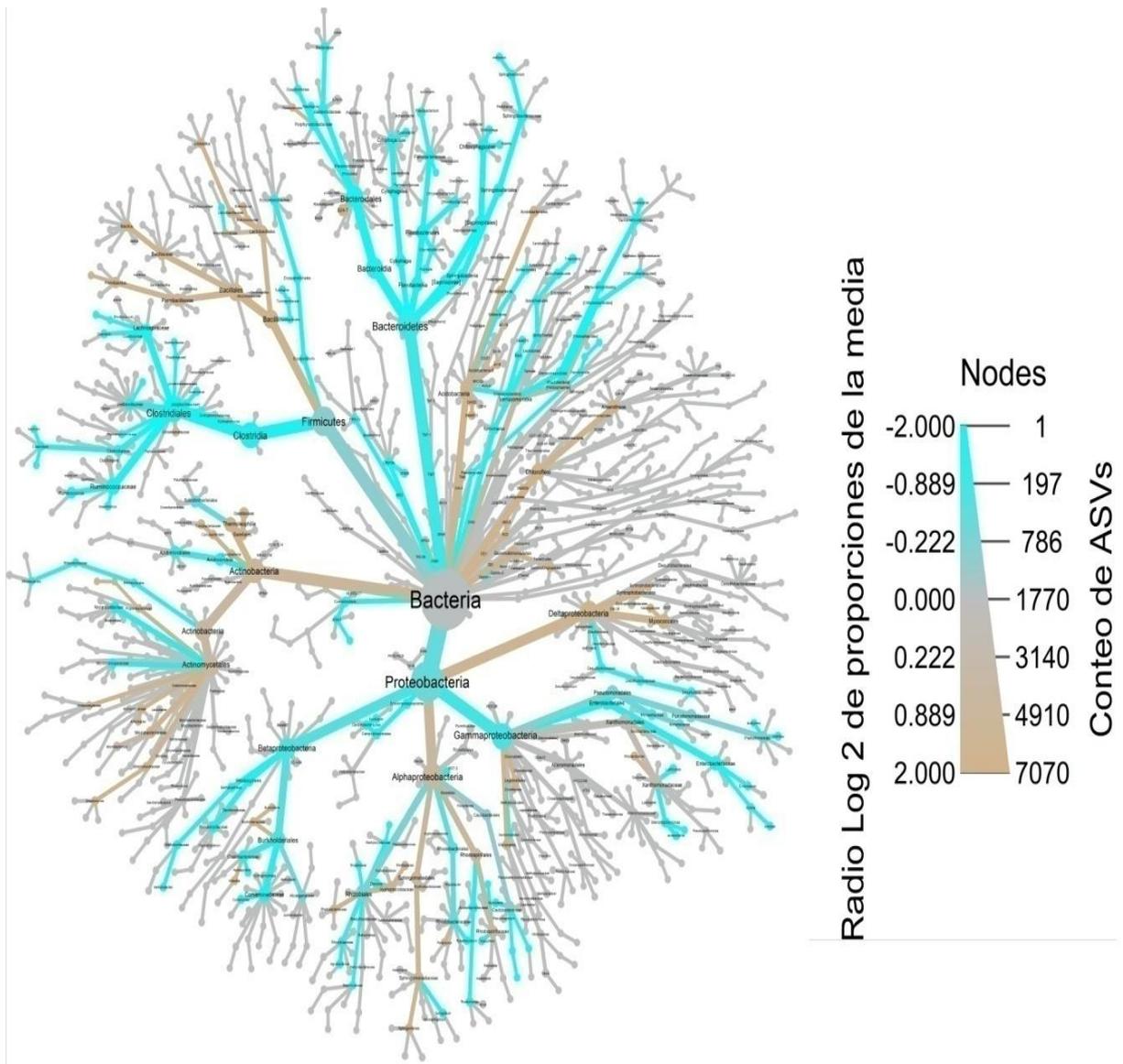


Figura 27. Árbol de calor diferencial que representa el cambio en la abundancia de taxones bacterianos entre plantas sanas y enfermas.

4.4.2. Análisis de biodiversidad beta

La comparación de especies se realizó entre estadios así como entre plantas sanas y enfermas mediante análisis de similitudes que emplean medidas de distancia que no consideran la filogenia (Bray-Curtis y Jaccard) y otras medidas que consideran la filogenia (Unifrac).

En la ordenación PCoA de la medida de Bray-Curtis se puede observar una separación de las muestras sanas (E0) y enfermas (E1 y E2). Sin embargo, entre el primer y segundo estadio de PC hubo una mayor similitud ya que las muestras se agruparon más cerca, en contraste con las muestras sanas que se agruparon mayormente en el componente principal 1 (Axis 1) con una cantidad de variación del 13.36% (Figura 28).

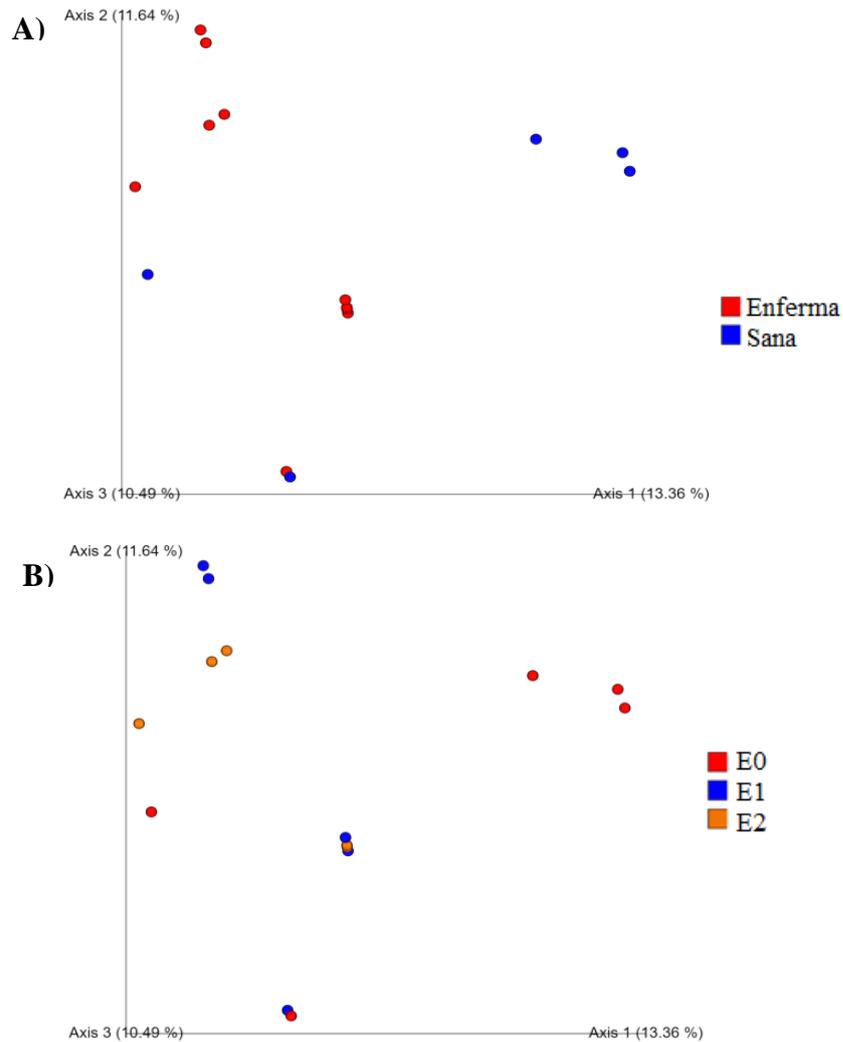


Figura 28. PCoA calculado utilizando medidas de Bray-Curtis para el gen 16S ARNr. La distancia entre los puntos indica el grado de diferencia entre las variables: A) Sanas y enfermas y B) Estadios de la PC (E1 y E2) y sanas (E0).

El índice Jaccard, que no considera la filogenia, se empleó para comparaciones a partir de la presencia o ausencia de especies presentes en las muestras. En la Figura 29 se puede observar que las muestras se agruparon mejor entre sanas y enfermas, en

contraste con cada estadio donde cada componente principal no presentó una mayor cantidad de variación.

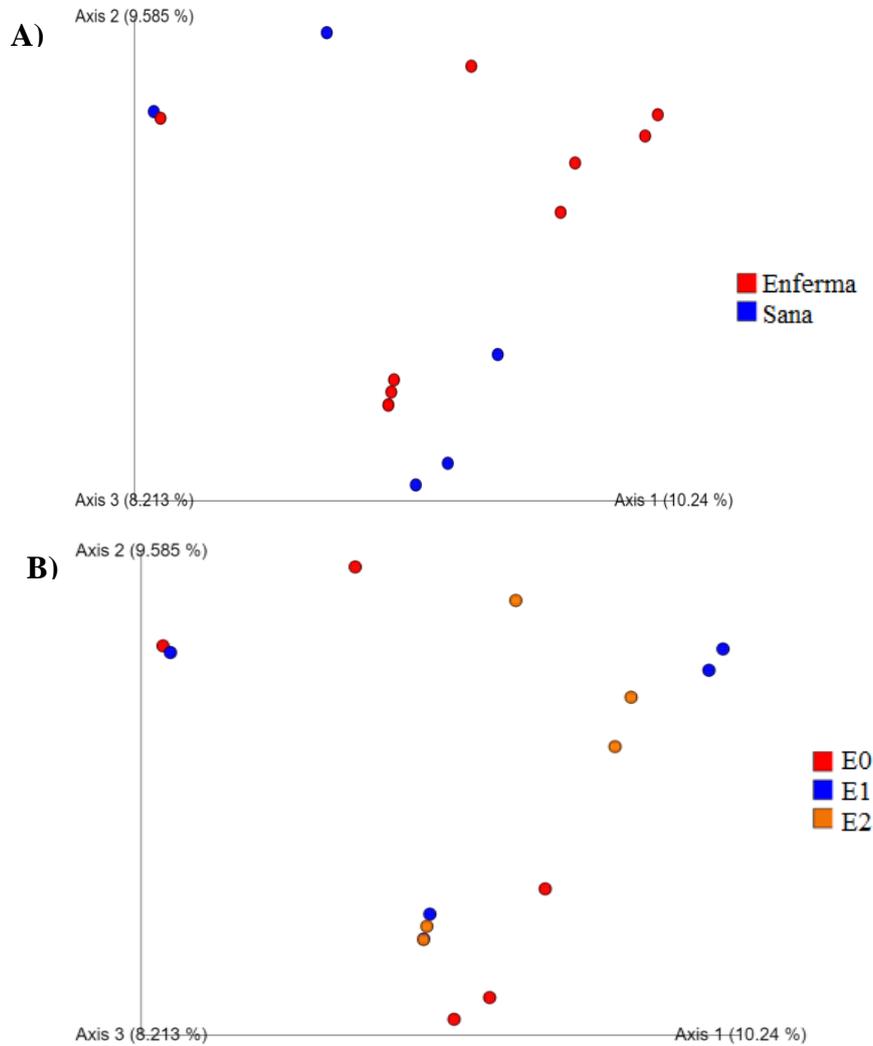


Figura 29. PCoA calculado utilizando medidas de Jaccard para el gen 16S ARNr. La distancia entre los puntos indica el grado de diferencia entre las variables: A) Sanas y enfermas y B) Estadios de la PC (E1 y E2) y sanas (E0).

Además, las comunidades microbianas se analizaron mediante la distancia Unifrac no ponderada (Figura 30) que considera la presencia o ausencia de taxones bacterianos observados y Unifrac ponderada (Figura 31) que considera la abundancia de taxones bacterianos.

En ambas medidas Unifrac se observó una separación de las muestras sanas y enfermas, mientras que las muestras del primer y segundo estadio se ordenaron juntas, indicando que a nivel de especies hay una mayor similitud entre las muestras agrupadas.

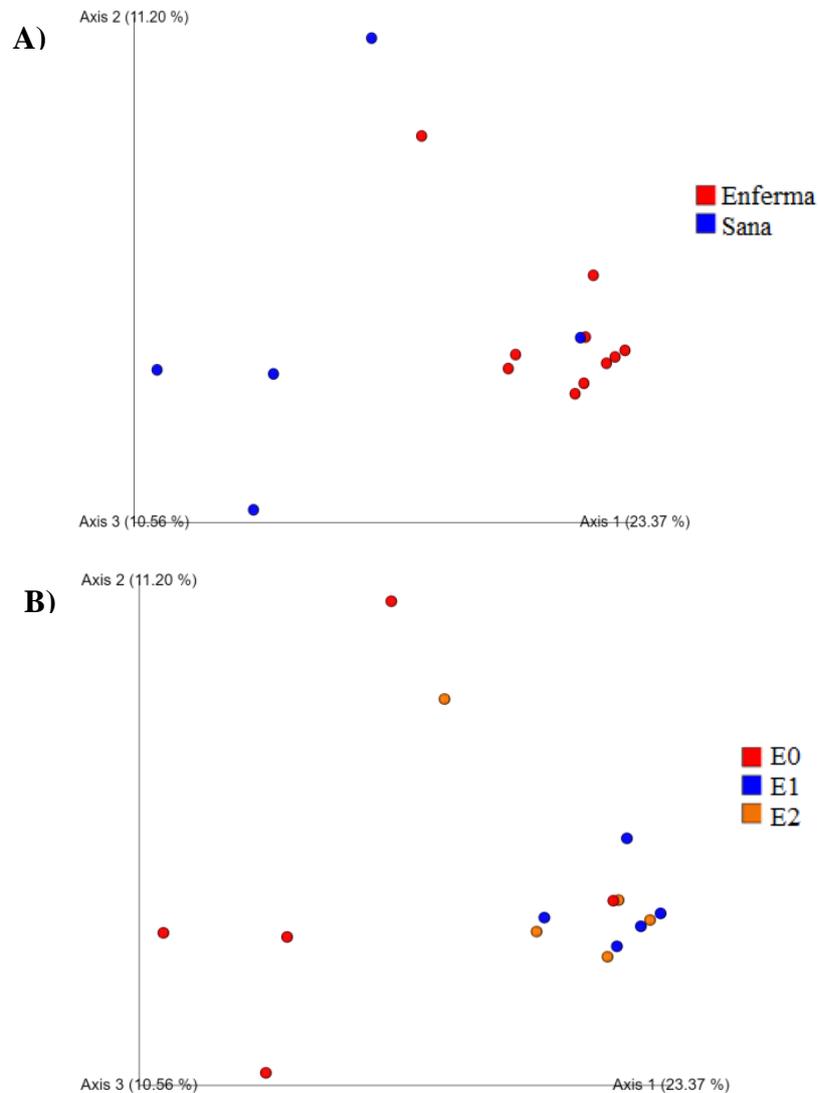


Figura 30. PCoA calculado utilizando medidas de Unweighted Unifrac para el gen 16S ARNr. La distancia entre los puntos indica el grado de diferencia entre las variables: A) Sanas y enfermas y B) Estadios de la PC (E1 y E2) y sanas (E0).

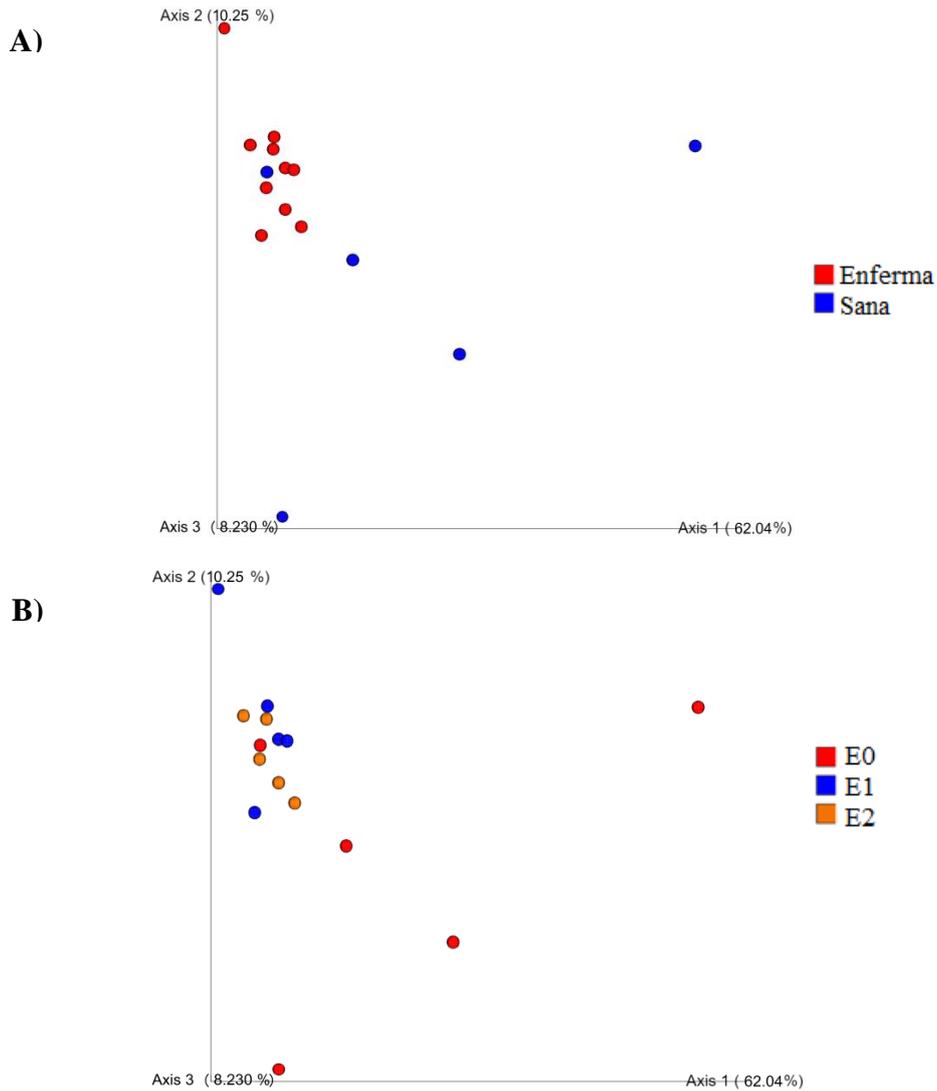


Figura 31. PCoA calculado utilizando medidas de Weighted Unifrac para el gen 16S ARNr. La distancia entre los puntos indica el grado de diferencia entre las variables: A) Sanas y enfermas y B) Estadios de la PC (E1 y E2) y sanas (E0).

El análisis de varianza multivariante permutacional (Permanova) con 10000 permutaciones indicó que existen diferencias significativas en la diversidad bacteriana de cada estadio (Tabla 17).

Tabla 17. Prueba de permutación de dispersiones multivariadas para bacterias.

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)	
Stadium	2	0.5878	0.3451	3.1618	0.0149	*
Residual	12	1.1156	0.6548			
Total	14	1.7034	1.0000			

Significado códigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

4.5. Aislamiento e identificación de cepas fúngicas asociadas a la PC

Se obtuvo un total de 90 cepas fúngicas de las muestras de cogollo en primer y segundo estadio de PC, de las cuales 34 procedieron de medios de cultivo PDA, 13 de CMA, 7 de agar centeno, 9 de AA, 18 del agar V8-J/PARPV8/V10VP, 3 PARP (PDA) y 6 de AN (Figura 32). Las muestras sanas y con PC sembradas en agar avena presentaron crecimiento de levaduras, no se observó crecimiento de hongos filamentosos.

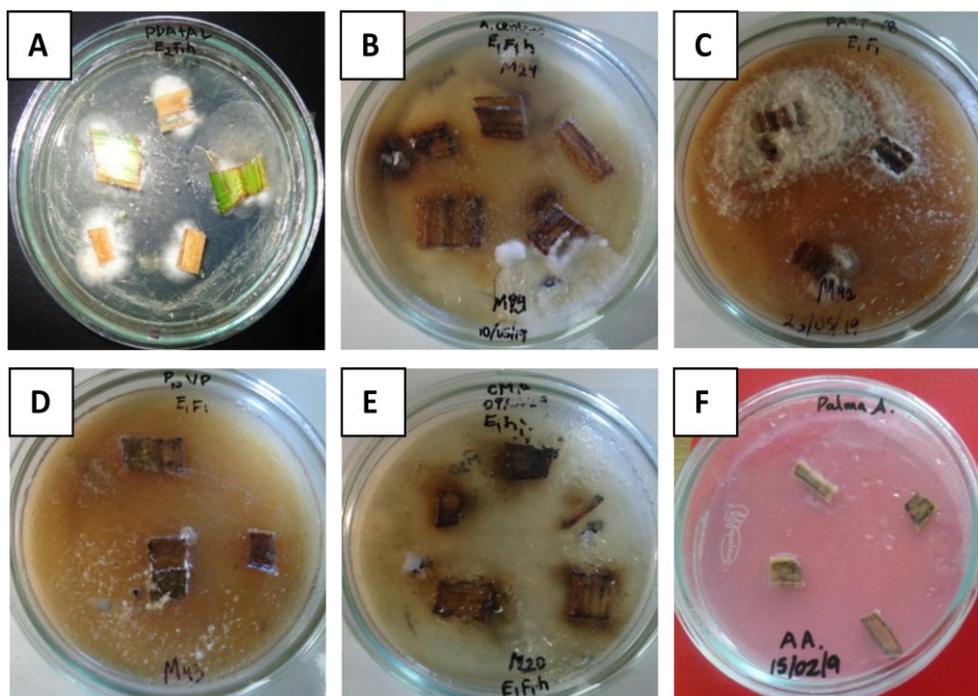


Figura 32. Hongos aislados del cogollo. Cogollo sembrado en: A) PDA, B) Agar Centeno, C) Agar PARP-V8, D) Agar P10VP-V8, E) CMA. F) Agar agua.

Con el uso de claves taxonómicas [130][131][132] los 90 aislados se identificaron a nivel de género describiendo coloración y textura de colonias, morfología de esporas y estructuras fúngicas visualizadas con tinción de azul de lactofenol. En la identificación de las 61 cepas del primer estadio de PC se obtuvieron 47 cepas de *Fusarium*, 5 cepas de *Trichoderma*, 5 cepas de *Thielaviopsis*, 2 cepas de *Aspergillus* y 2 cepas de *Penicillium*. En las 29 cepas del segundo estadio de PC se observaron 23 cepas de *Fusarium*, 1 cepa de *Trichoderma*, 1 cepa de *Penicillium* y 4 cepas de *Mucor* (Tabla 18).

Tabla 18. Cepas fúngicas identificadas a nivel de género en base a sus características macroscópicas y microscópicas.

# cepas	Color colonias (anverso)	Color colonias (reverso)	Textura colonia	Morfología	Género
70 ^a	Blancas con centros: café, amarillo, violeta, beige, y rojizo	Amarilla, ocre, beige, café, beige, blanca y tonos rojizos	Algodonosa	Macroconidia curvada con septos. Fiálide fina y alargada, fiálide gruesa y corta, y fiálide ramificadas	<i>Fusarium</i>
6 ^b	Blanca con exudados verdes	Blanca	Algodonosa	Esporas redondas y en racimos. Conidióforos con ramas laterales cortas con conidios color verde	<i>Trichoderma</i>
4 ^c	Beige	Beige	Algodonosa	Esporangios grandes que contienen endosporas dentro. Hifa oscura, gruesa y alargada.	<i>Mucor</i>
5 ^d	Verde oscuro	Verde oscuro	Velosa	Conidios de color pardo oscuro y forma cilíndrica. Hifas septadas con fiálides hialinas	<i>Thielaviopsis</i>
3 ^e	Verde con bordes blancos	Blanca	Aterciopelada	Microsporas. Conidióforos tabicados con métulas y fiálides en forma de pincel	<i>Penicillium</i>
2 ^f	Verde con borde blanco	Beige	Pulverulenta	Microsporas. Hifas hialinas con conidios globosos.	<i>Aspergillus</i>

Distribución de cepas por estadio: ^a 47 cepas en primer estadio y 23 cepas en segundo estadio. ^b 5 cepas en primer estadio y 1 cepa en segundo estadio. ^c 4 cepas en segundo estadio. ^d 5 cepas en primer estadio. ^e 2 cepas en primer estadio y 1 cepa en segundo estadio. ^f 2 cepas en primer estadio.

En base a las características de los cultivos y estructuras microscópicas se seleccionaron 21 cepas para su identificación molecular. Del proceso de extracción de ADN se obtuvo concentraciones de ADN entre 20 a 2000 ng/μL medidas por espectrofotometría en el equipo Nanodrop con una relación 260/280 entre 1.8 a 2. Mediante PCR se obtuvieron amplicones de aproximadamente 600 pb, los mismos que coinciden con el tamaño de la región amplificada de los primers ITS5 e ITS4 (Figura 33).

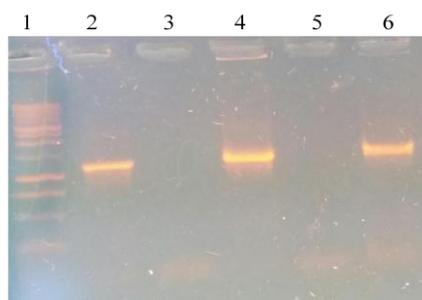


Figura 33. Electroforesis de los productos PCR de los aislados (gen ITS), en gel de agarosa al 1.5%, amplificados con primers ITS4 e ITS5. Pocillo 1: 1 Kb Plus DNA Ladder Invitrogen. Pocillos 2, 4 y 6: aislados fúngicos.

De las 21 cepas seleccionadas para análisis molecular se identificó a 9 especies distintas en total. En las muestras del primer estadio de PC (Tabla 19) se obtuvo 12 cepas del género *Fusarium* (7 *F. solani*, 1 *F. sacchari*, 1 *F. cyanescens*, 1 *F. oxysporum*, 1 *F. ferrugineum* y 1 *F. ambrosium*), 2 cepas de *Trichoderma koningii* y 7.17% *Thielaviopsis paradoxa*. En el segundo estadio (Tabla 20) se identificó molecularmente a 5 cepas del género *Fusarium* (2 *F. solani*, 2 *F. cyanescens*, 1 *F. ambrosium*) y 1 cepa de *Trichoderma atroviride*.

Tabla 19. Aislados fúngicos del cogollo de palma aceitera en primer estadio de PC identificados mediante secuenciación Sanger del gen ITS.

Cepa	Método de aislamiento	Organismo de mayor similitud (N° de acceso GenBank)	% de identidad a nivel de nucleótidos con Blast
E1H-2	CMA	<i>Fusarium solani</i> (MK968891.1)	99.10%
E1H-3	CMA	<i>Fusarium solani</i> (MK446913.1)	99.65%
E1H-15	PARPV8	<i>Fusarium solani</i> (KF918554.1)	98.94%
E1H-16	PARPV8	<i>Fusarium solani</i> (MK968891.1)	100.00%
E1H-24	PDA	<i>Fusarium solani</i> (KF030977.1)	100.00%
E1H-27	PDA	<i>Fusarium solani</i> (MF495401.1)	100.00%
E1H-41	PDA	<i>Fusarium solani</i> (MF495401.1)	99.82%
E1H-19	PDA	<i>Fusarium sacchari</i> (KC464630.1)	100.00%
E1H-28	AN	<i>Fusarium cyanescens</i> (AB190389.1)	99.46%
E1H-7	PDA	<i>Trichoderma koningii</i> (MF780846.1)	99.84%
E1H-8	PDA	<i>Trichoderma koningii</i> (MF780846.1)	100.00%
E1H-6	PDA	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> (MW082790.1)	100.00%
E1H-35	AA	<i>Fusarium oxysporum</i> (MF467275.1)	99.82%
E1H-17	P10VP	<i>Fusarium ferrugineum</i> (LT746276.1)	99.82%
E1H-39	P10VP	<i>Fusarium ambrosium</i> (EU329669.1)	99.60%

Tabla 20. Aislados fúngicos del cogollo de palma aceitera en segundo estadio de PC identificados mediante secuenciación Sanger del gen ITS.

Cepas	Método de aislamiento	Organismo de mayor similitud (N° de acceso GenBank)	% de identidad a nivel de nucleótidos con Blast
E2H-1	PDA	<i>Fusarium solani</i> (KY785015.1)	99.82%
E2H-28	AA	<i>Fusarium solani</i> (KY785015.1)	99.66%
E2H-2	PDA	<i>Fusarium cyanescens</i> (AB190389.1)	100.00%
E2H-14	CMA	<i>Fusarium cyanescens</i> (AB190389.1)	100.00%
E2H-3	PDA	<i>Trichoderma atroviride</i> (MH283876.1)	100.00%
E2H-15	CMA	<i>Fusarium ambrosium</i> (EU329669.1)	99.62%

En la Figura 34 se puede observar las características macroscópicas de las cepas como el color, textura y presencia de anillos en medio PDA. En la Figura 35 se puede observar las esporas y morfología de los hongos aislados.

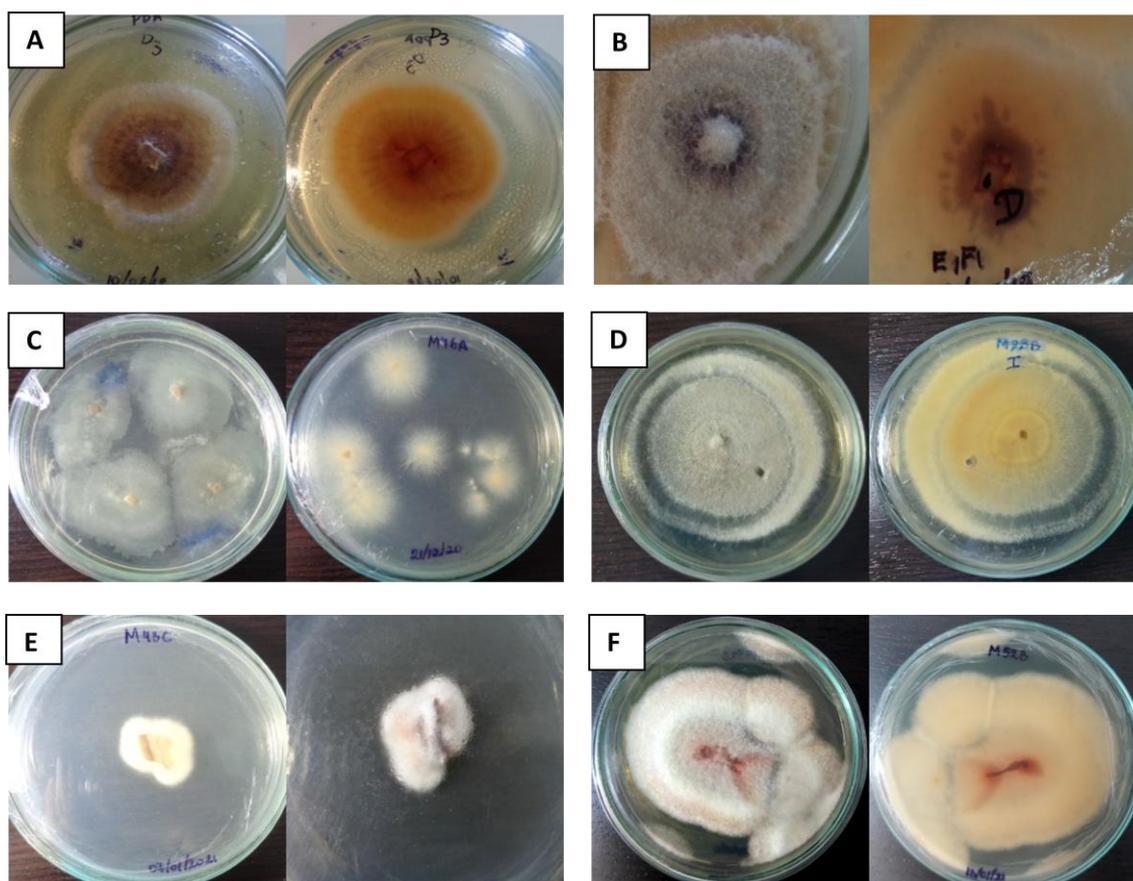


Figura 34. Fotografías del anverso y reverso de los cultivos de los hongos aislados: A) *Fusarium solani*, B) *Fusarium oxysporum*, C) *Fusarium sacchari*, D) *Fusarium cyanescens* (*Phialophora cyanescens*), E) *Fusarium ferrugineum* (basónimo *Neocosmospora ferruginea*), F) *Fusarium ambrosium* (sinónimo homotípico *Neocosmospora ambrosia*)

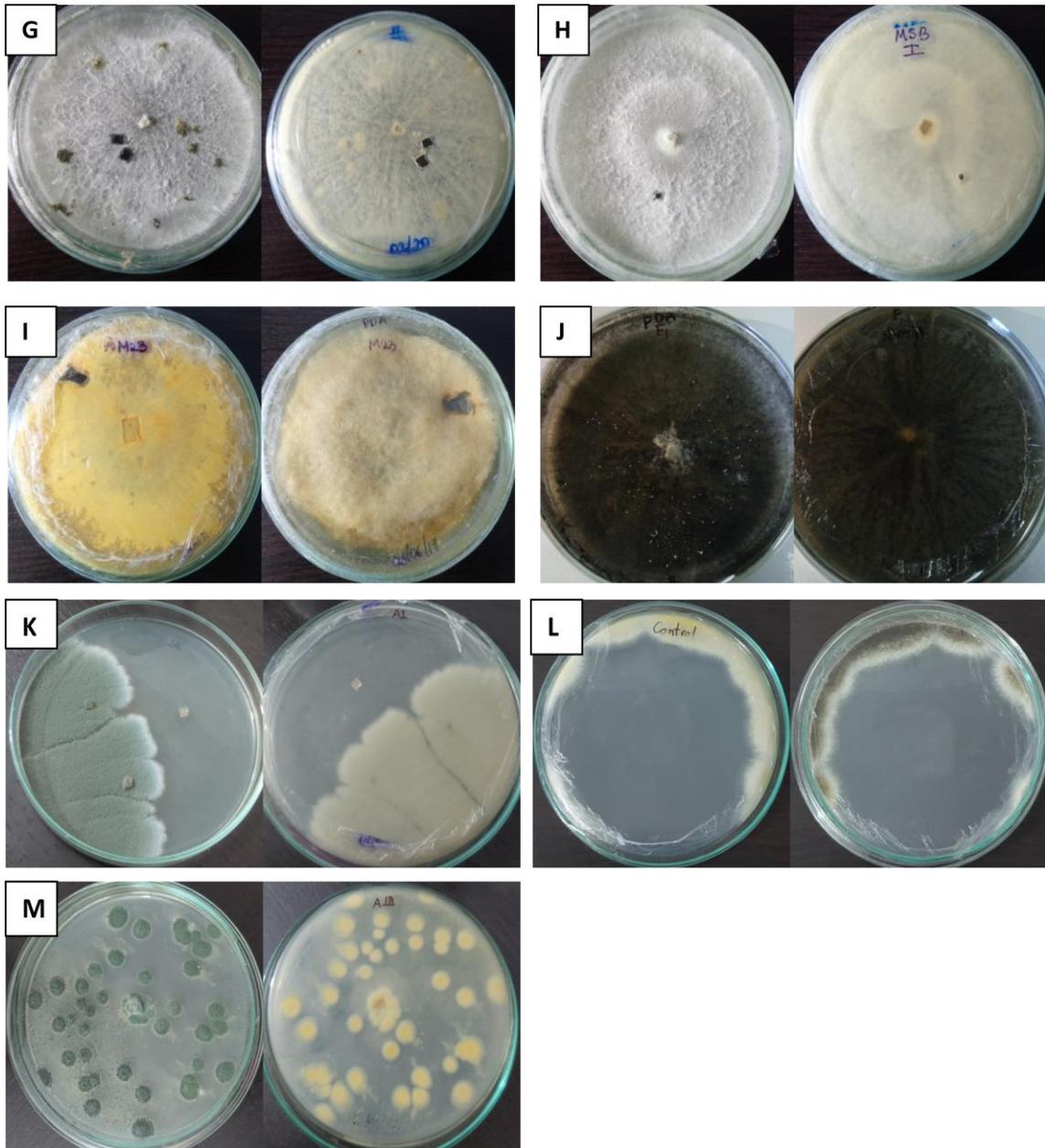


Figura 34 (Continuación). Fotografías del anverso y reverso de los cultivos de los hongos aislados: G) *Trichoderma koningii*, H) *Trichoderma atroviride*, I) *Mucor* sp. J) *Thielaviopsis paradoxa*, K) *Penicillium* sp., L) *Aspergillus* sp., M) *Aspergillus* sp.

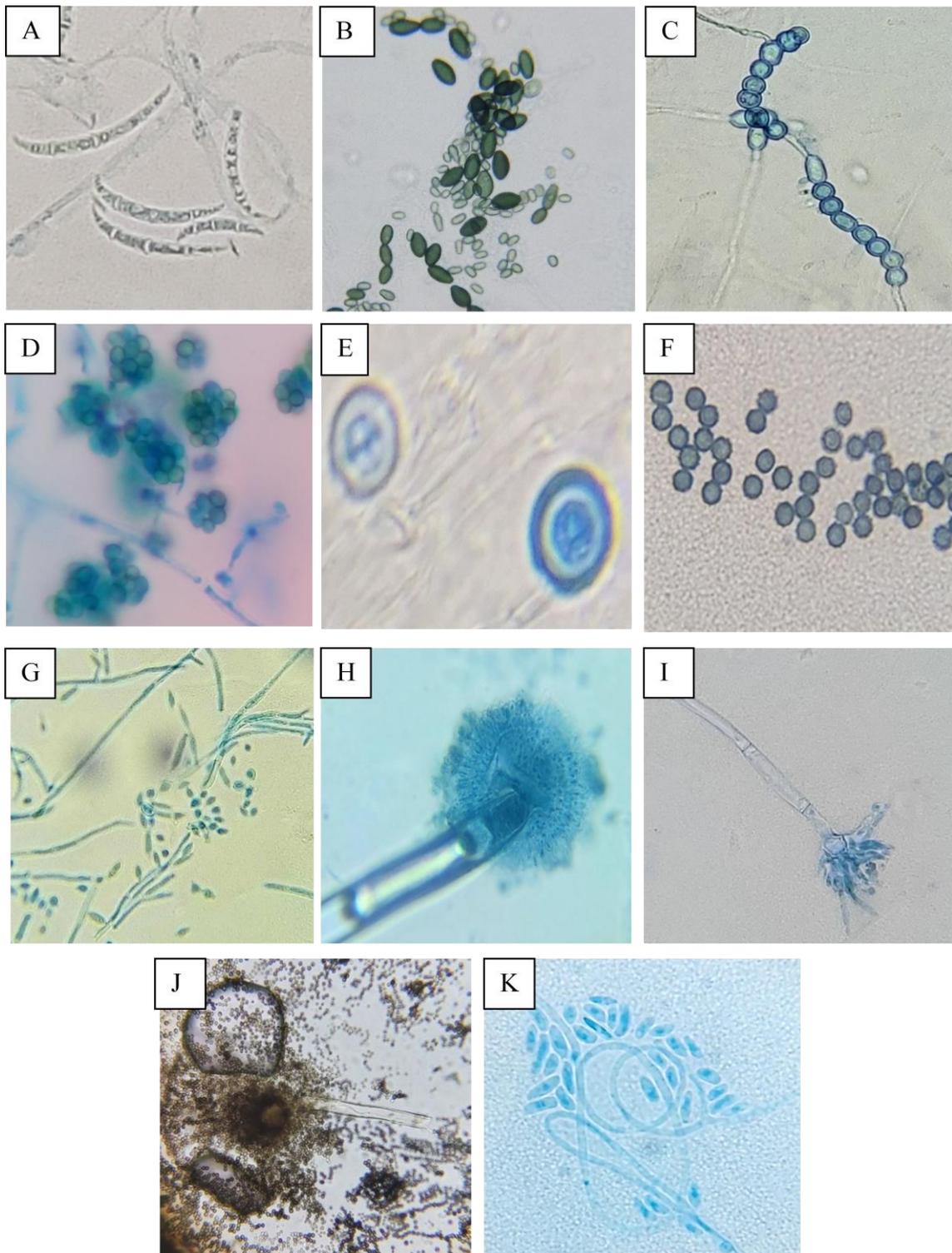


Figura 35. Tinción de esporas de los aislados fúngicos: A) Macroconidia de *Fusarium sacchari*, B) Conidios de *Thielaviopsis paradoxa*, C) Clamidosporas de *Fusarium solani*, D) Conidios de *Trichoderma koningii*, E) Clamidosporas de *Trichoderma atroviride*, F) Esporas de *Aspergillus*, G) Microsporas de *Penicillium* sp., H) Conidióforo *Aspergillus*, I) Conidióforo *Penicillium* sp., J) Conidióforo de *Aspergillus*, K) Microconidios de *Fusarium ferrugineum*.

4.6. Análisis filogenético de los aislados fúngicos

El árbol filogenético se construyó a partir del gen ITS del género *Fusarium* mediante el método de máxima verosimilitud, donde el mejor modelo estimado por MEGA X fue K2+I (Kimura 2-parameter), que presentó un menor valor BIC (Criterio de Información Bayesiano) de 4012.125, valor AICc (Criterio de Información Akaike corregido) de 3621.425, un valor lnL (valor de máxima verosimilitud) de -1755.372, 55 parámetros y un cociente de transición/transversión (*R*) de 0.93 (Tabla 21).

Tabla 21. Modelos de sustitución de nucleótidos estimados en MEGA X para el gen ITS de aislados fúngicos.

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
K2+I	55	4012.125	3621.425	-1755.372	0.14	n/a	0.93
K2+G	55	4013.348	3622.647	-1755.983	n/a	3.32	0.94
K2+G+I	56	4015.675	3617.884	-1752.589	0.09	3.67	0.94
T92+I	56	4016.950	3619.159	-1753.226	0.13	n/a	0.93
K2	54	4017.424	3633.815	-1762.579	n/a	n/a	0.91
T92+G	56	4017.745	3619.953	-1753.624	n/a	3.28	0.94
JC+I	54	4017.777	3634.168	-1762.756	0.16	n/a	0.50
JC+G	54	4021.236	3637.627	-1764.485	n/a	3.25	0.50
JC+G+I	55	4022.005	3631.305	-1760.312	0.13	3.67	0.50
T92	55	4022.047	3631.346	-1760.333	n/a	n/a	0.92
T92+G+I	57	4023.719	3618.836	-1752.053	0.09	3.67	0.95
JC	53	4025.762	3649.245	-1771.306	n/a	n/a	0.50
HKY+I	58	4036.744	3624.771	-1754.007	0.13	n/a	0.94
HKY+G	58	4037.734	3625.762	-1754.502	n/a	3.35	0.94
TN93+I	59	4041.479	3622.416	-1751.816	0.13	n/a	0.94
TN93+G	59	4041.504	3622.442	-1751.829	n/a	3.32	0.95
HKY	57	4041.625	3636.743	-1761.006	n/a	n/a	0.92
HKY+G+I	59	4042.422	3623.359	-1752.288	0.09	3.67	0.95
TN93	58	4045.425	3633.452	-1758.348	n/a	n/a	0.92
TN93+G+I	60	4046.601	3620.449	-1749.820	0.08	3.60	0.96
GTR+I	62	4065.687	3625.358	-1750.247	0.13	n/a	0.93
GTR+G	62	4066.228	3625.898	-1750.517	n/a	3.35	0.95
GTR	61	4069.957	3636.716	-1756.939	n/a	n/a	0.92

En el árbol filogenético de la Figura 36, cuyas ramas externas estuvieron soportado por un valor *bootstrap* mayor a 50%, el género *Fusarium* se dividió en seis clados. Las cepas de *Fusarium* aisladas en este estudio se ubicaron en cuatro de los clados, encontrándose 10 cepas en el primer clado, 4 cepas en el segundo clado, una cepa en el cuarto clado y 2 cepas en el sexto clado.

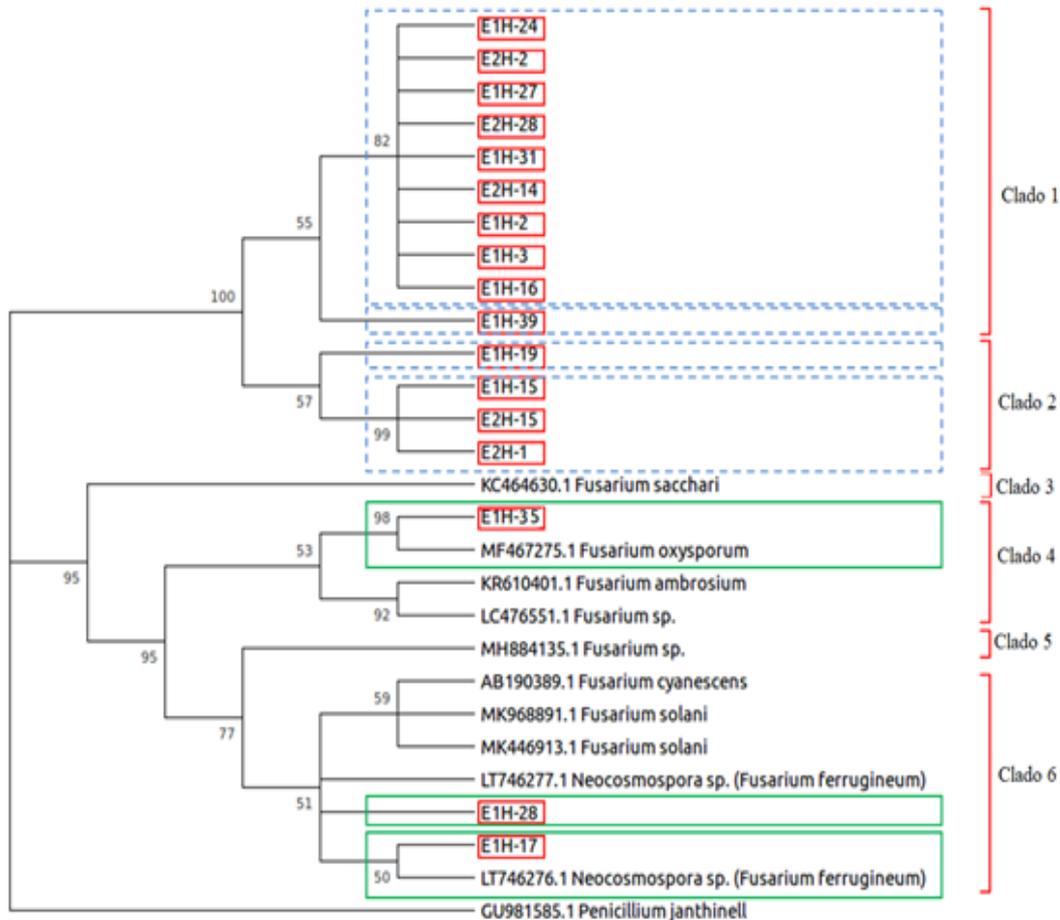


Figura 36. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de secuencias de la región ITS de hongos aislados (cuadro rojo) del cogollo de la palma aceitera. Los números en los nodos representan los valores de soporte estadístico (*bootstrap*).

Las cepas del primer y segundo clado (cuadrado azul) formaron cuatro subclados sin agruparse con ninguna de las secuencias de referencia escogidas en este estudio. En el cuarto clado la cepa E1H-35 y la secuencia de referencia *Fusarium oxysporum* (MF467275.1) formaron otro subclado (cuadrado verde). En el sexto clado, la cepa E1H-17 junto con la secuencia de referencia *Fusarium ferrugineum* (LT46276.1) formaron un subclado (cuadrado verde) y se observó una estrecha relación filogenética

con el subclado conformado por la cepa E1H-17 (cuadrado verde) al compartir un ancestro común (nodo).

El grupo externo (outgroup) fue *Penicillium janthinell*, el cual formó un clado fuera de la ramificación del árbol.

4.7. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas asociadas a la PC

De los muestreos se obtuvieron 7 aislados bacterianos sembrados en agar nutriente. Para una primera identificación de géneros patógenos relacionados con la PC, se empleó la tinción Gram y las pruebas descritas en la Tabla 22 [124].

Tabla 22. Pruebas de identificación evaluadas en aislados bacterianos.

Cepa	Tinción Gram	Prueba catalasa	Prueba oxidasa	H ₂ S	Motilidad	Úrea	Pudrición de papa	Color colonias
E1B-1	-	+	-	-	+	-	+	Blanca
E2B-2	-	-	-	-	+	-	-	Blanca
E2B-3	-	+	-	-	+	-	+	Blanca
E1B-4	-	+	-	-	+	-	+	Blanca
E1B-5	+	+	-	-	+	-	-	Blanca
E2B-6	-	+	-	-	+	-	-	Blanca
E2B-7	-	+	-	-	-	-	-	Blanca

+ positiva; - negativa

Además, los aislados se inocularon sobre rodajas de papa y se obtuvo tres cepas que maceraron el tejido (Figura 37), por consiguiente se las consideró como candidatas al género *Erwinia*. En el análisis microscópico de las cepas bacterianas se observó bacilos con tinción gramnegativa a excepción de la cepa E1B-5 que presentó una tinción grampositiva. La identificación molecular se realizó únicamente a las cepas con tinción gramnegativas y forma de bastón (Tabla 23), puesto que es una característica de los

miembros del orden Enterobacteriales, los cuales han sido implicados como principales fitopatógenos en algunos cultivos [152].

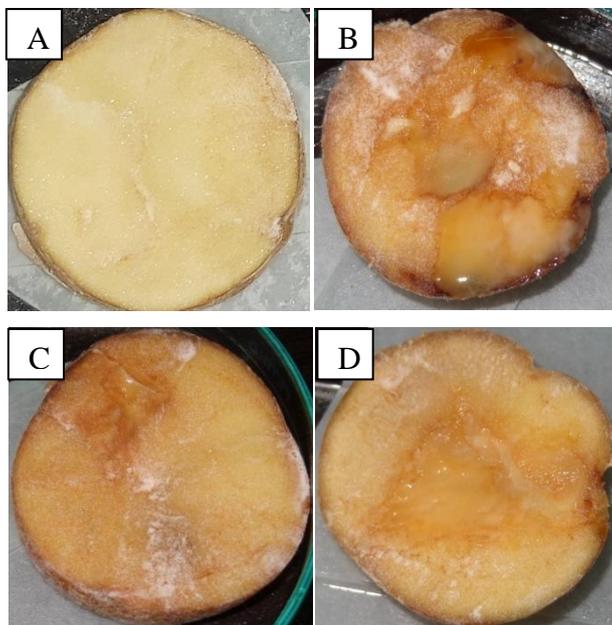


Figura 37. Prueba de pudrición de papa a las 72 horas. A) Control sin inoculación. B) Tejido macerado inoculado con la cepa E1B-1. C) Tejido macerado inoculado con la cepa E2B-3. D) Tejido macerado inoculado con la cepa E1B-4.

Tabla 23. Identificación molecular de los aislados bacterianos mediante secuenciación Sanger del gen 16S ARNr.

Cepa	Organismo de mayor similitud (N° de acceso GenBank)	% de identidad a nivel de nucleótidos con Blast
E1B-1	<i>Escherichia coli</i> (NR_024570.1)	99.23%
E2B-3	<i>Citrobacter amalonaticus</i> (NR_104823.1)	99.21%
E1B-4	<i>Citrobacter farmeri</i> (NR_024861.1)	96.39%
E1B-5	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (NR_126208.1)	100.00%
E2B-6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (NR_040804.1)	96.95%
E2B-7	<i>Pseudomonas parafulva</i>	90.60%

4.8. Evaluación de la patogenicidad de aislados

Síntomas similares a la PC, como clorosis y necrosis en hojas, fueron notorios a los 40 días de evaluación. A los 50 días se realizó una segunda revisión de síntomas, pero no

existió desarrollo de síntomas a excepción del tratamiento A5 (E1H-39, *Fusarium ambrosium*), que presentó lesiones necróticas en una de las plantas (Figura 38).



Figura 38. Evolución de síntomas del día 40 (izquierda) al día 50 (derecha) en el tratamiento A5 con la cepa E1H-39 (*Fusarium ambrosium*).

En la Tabla 24 se muestran los resultados de la capacidad infectiva de los diferentes microorganismos y sus métodos de inoculación.

Tabla 24. Pruebas de patogenicidad. Aislados inoculados por diversos métodos en la palma aceitera.

Tratamiento	Cepa Inoculada	Métodos de Inoculación (Repeticiones)												
		Punción			Contacto			Goteo						
		I	II	III	I	II	III	I	II	III				
A1	E1H-28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	E1H-17	2	0	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
A3	E1H-24	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
A4	E1H-35	3	4	3	3	4	3	2	2	2	2	2	2	2
A5	E1H-39	4	3	2	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0
A6	E1H-19	2	2	0	2	0	0	0	2	0	0	2	0	0
A7	E1H-6	2	0	0	2	0	2	2	1	0	2	1	0	0
A8	E1H-15	4	3	3	3	2	0	2	2	2	2	2	2	2
A9	E1H-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A10	Mezcla de aislados	2	2	2	2	0	0	2	0	0	2	0	0	0
A11	Control (agua)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

El análisis de varianza para la variable síntomas mostró que existen diferencias estadísticas significativas para los tipos de microorganismos y el método de inoculación (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis de la varianza para la variable sintomatología en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	112.30	14	8.02	5.88	<0.0001
Tipo de microorganismo	94.99	10	9.50	6.96	<0.0001
Método de inoculación	11.23	2	5.62	4.11	0.0198
Interacción	6.08	2	3.04	2.23	0.1142
Error	114.6	84	1.37		
Total	226.99	98			

Al comparar las medias de cada tratamiento con la prueba de Tukey (Tabla 26) se observó que la cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) infectó un mayor número de plantas por los diferentes métodos de inoculación, así como las cepas E1H-39 (*Fusarium ambrosium*) y E1H-15 (*Fusarium solani*).

Tabla 26. Prueba Tukey para la variable tipo de microorganismo en InfoStat.

Tratamiento	Cepa inoculada	Medias	n	E.E.	Resultado*
A4	E1H-35	2.89	9	0.39	A
A5	E1H-39	2.44	9	0.39	A B
A8	E1H-15	2.33	9	0.39	A B C
A10	Mezcla de aislados	1.11	9	0.39	A B C D
A7	E1H-6	1.00	9	0.39	B C D
A6	E1H-19	0.89	9	0.39	B C D
A2	E1H-17	0.89	9	0.39	B C D
A3	E1H-24	0.56	9	0.39	C D
A9	E1H-2	0,00	9	0.39	D
A1	E1H-28	0,00	9	0.39	D
A11	Control	0,00	9	0.39	D

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

Se observó sintomatología en las hojas mediante los tres métodos de inoculación, donde existió diferencias significativas (valor $p=0.0198$) como se muestra en la Tabla 25. Por tanto, la prueba de Tukey (Tabla 27) confirmó que el método de inoculación por punción permitió la infección de un mayor número de plantas.

Tabla 27. Prueba Tukey para la variable método de inoculación en InfoStat.

Método de inoculación	Medias	n	E.E.	Resultado*
Punción	1,42	33	0.20	A
Contacto	1,24	33	0.20	A B
Goteo	0,64	33	0.20	B

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

En la Figura 39 se puede observar la cuantificación de síntomas respecto al microorganismo inoculado. Las barras representan el grado de síntomas externos (Tabla 8) de pudrición de cogollo en palma aceitera a los 55 días de acuerdo al método de inoculación de las cepas.

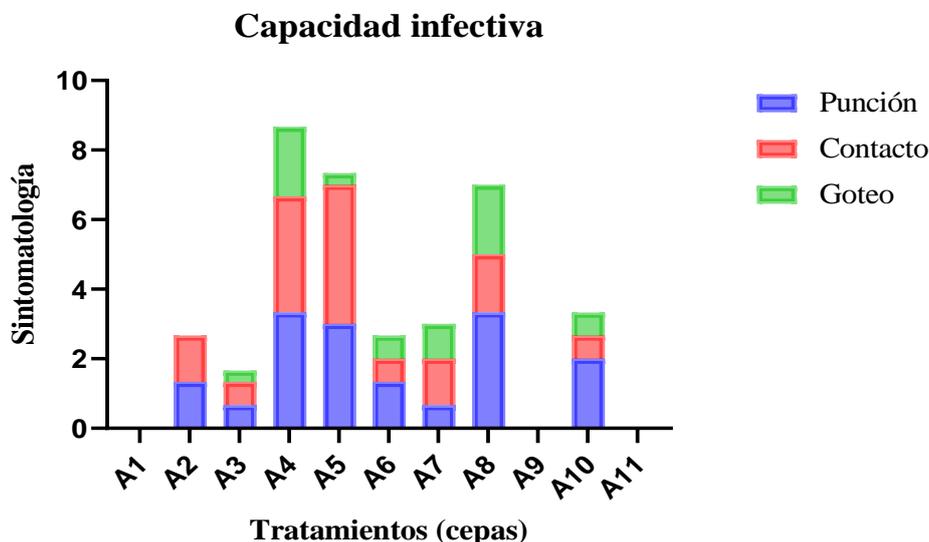


Figura 39. Capacidad infectiva de las diferentes cepas de acuerdo a la cuantificación de síntomas en cada método de inoculación. **A1:** Cepa E1H-28 (*Fusarium cyanescens*); **A2:** Cepa E1H-17 (*Fusarium ferrugineum*); **A3:** Cepa E1H-24 (*Fusarium solani*); **A4:** Cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*); **A5:** Cepa E1H-39 (*Fusarium ambrosium*); **A6:** Cepa E1H-19 (*Fusarium sacchari*); **A7:** Cepa E1H-6 (*Thielaviopsis paradoxa*); **A8:** Cepa E2H-15 (*Fusarium ambrosium*); **A9:** Cepa E1H-15 (*Fusarium solani*); **A10:** Mezcla de aislados; **A11:** Control.

A los 40 días las plantas infectadas con la cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) de la Figura 40 y la cepa E1H-15 (*Fusarium solani*) de la Figura 41 presentaron síntomas similares a la PC, como clorosis y necrosis en hojas, mientras que a los 55 días la cepa E1H-39 (*Fusarium ambrosium*) presentó síntomas (Figura 42).

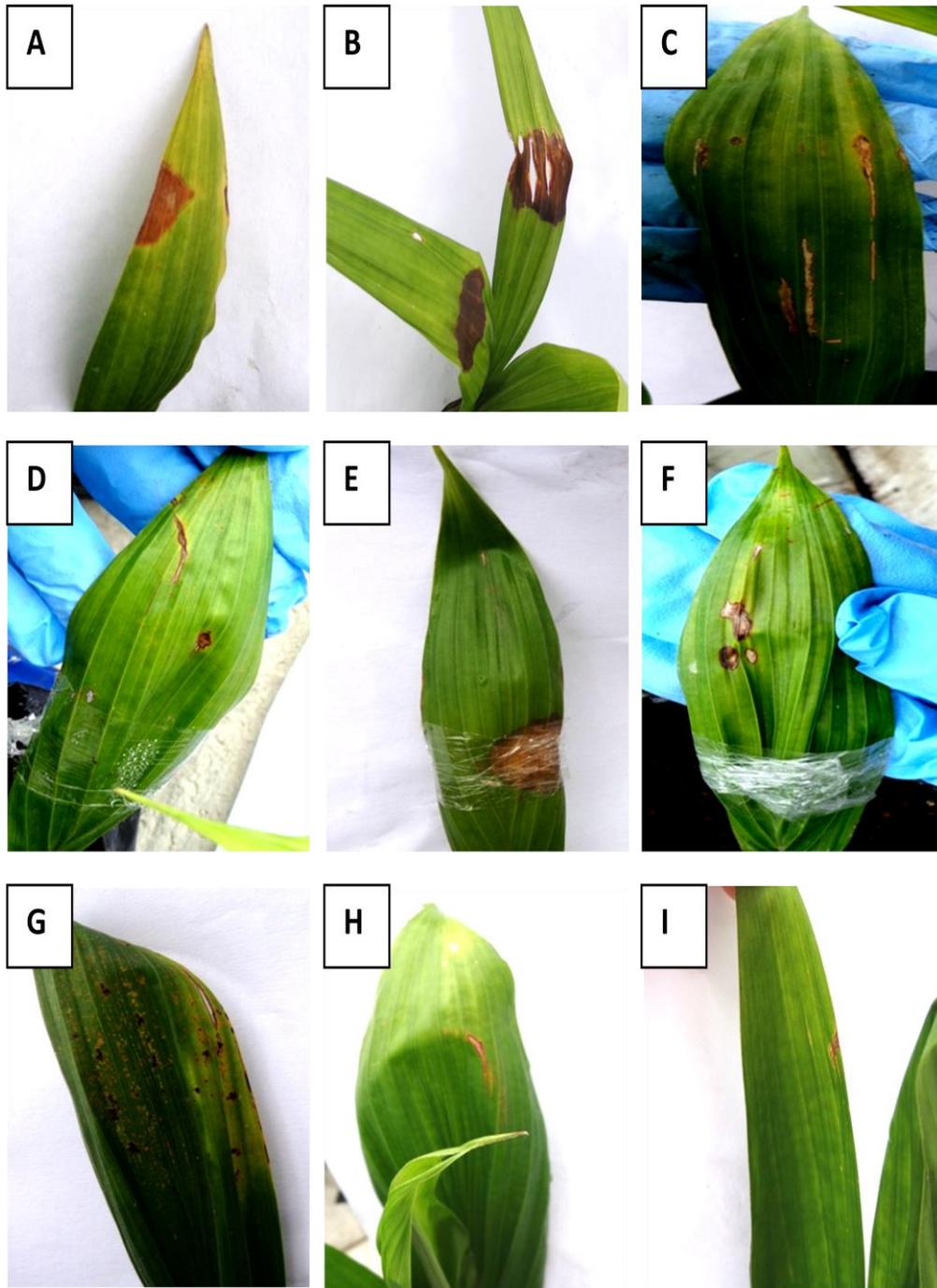


Figura 40. Evaluación de síntomas externos con la cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*). A-C: Lesiones necróticas en hojas inoculadas por punción, D-F: Lesiones necróticas en hojas inoculadas por contacto, G-I: Lesiones necróticas en la hoja inoculada por goteo en cada planta.

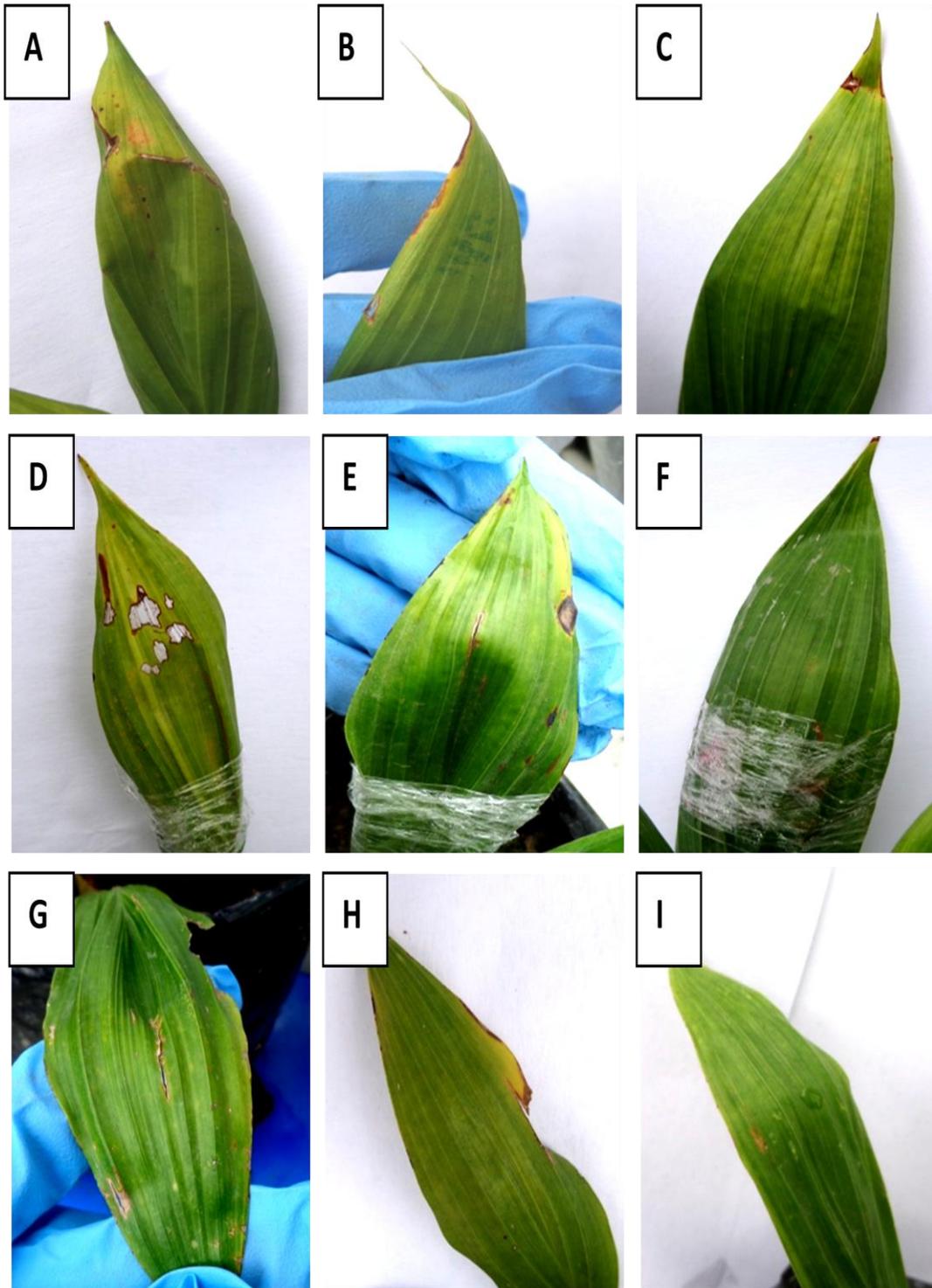


Figura 41. Evaluación de síntomas externos con la cepa E1H-15 (*Fusarium solani*). A-C: Lesiones necróticas en hojas inoculadas por punción. D-F: Lesiones necróticas en hojas inoculadas por contacto. G-I: Lesiones necróticas en la hoja inoculada por goteo en cada planta.

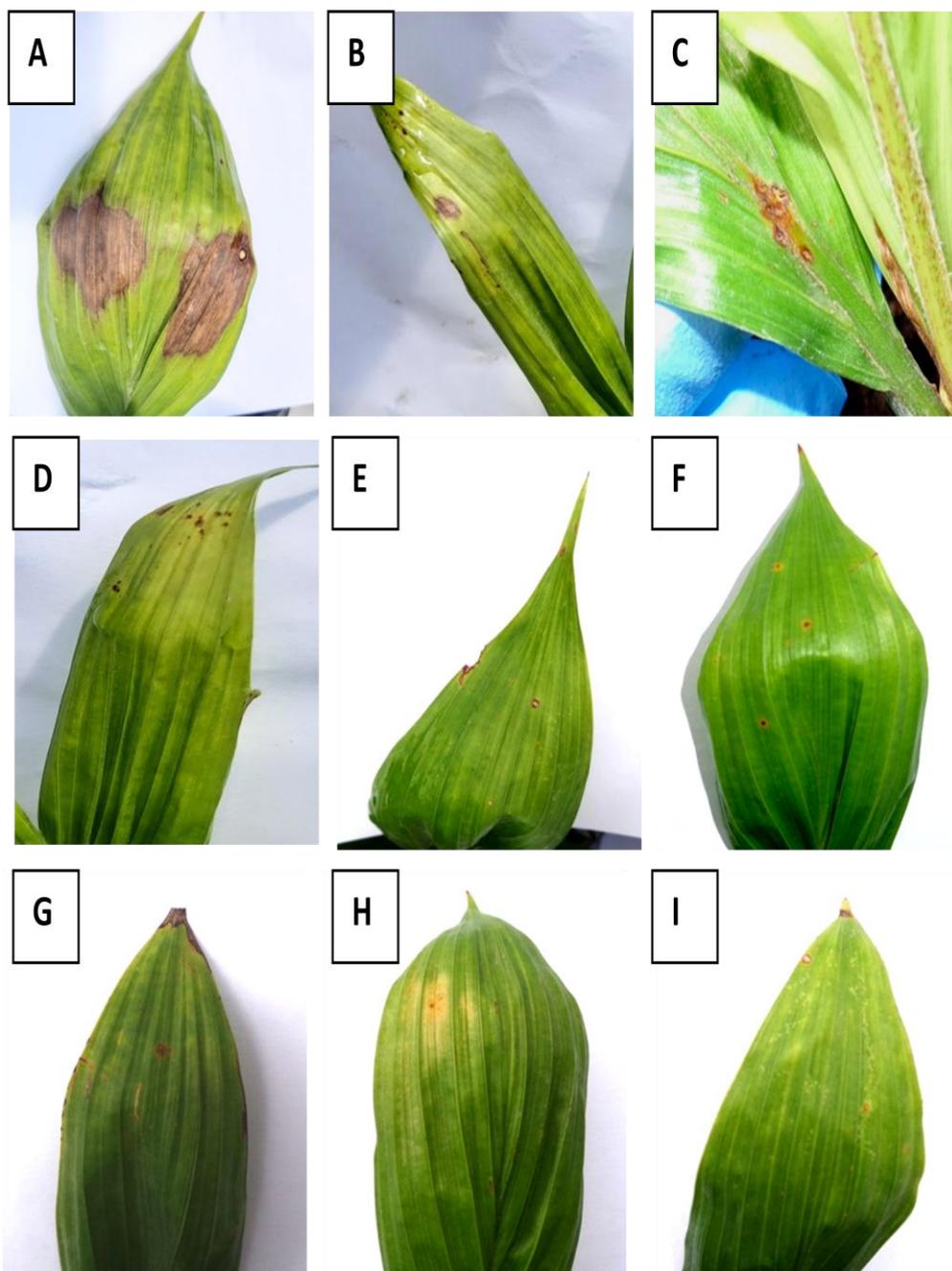


Figura 42. Evaluación de síntomas externos con la cepa E1H-39 (*Fusarium ambrosium*). A-C: Lesiones necróticas en hojas inoculadas por punción, D-F: Lesiones necróticas en hojas inoculadas por contacto, G-I: Lesiones necróticas en la hoja inoculada por goteo en cada planta.

De los trozos de hojas con lesiones necróticas sembrados en PDA, solamente en los tratamientos con las cepas E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) y E1H-15 (*Fusarium solani*) se obtuvieron hongos con características iguales a los hongos inoculados al principio, como se puede observar en las Figura 43 y 44.

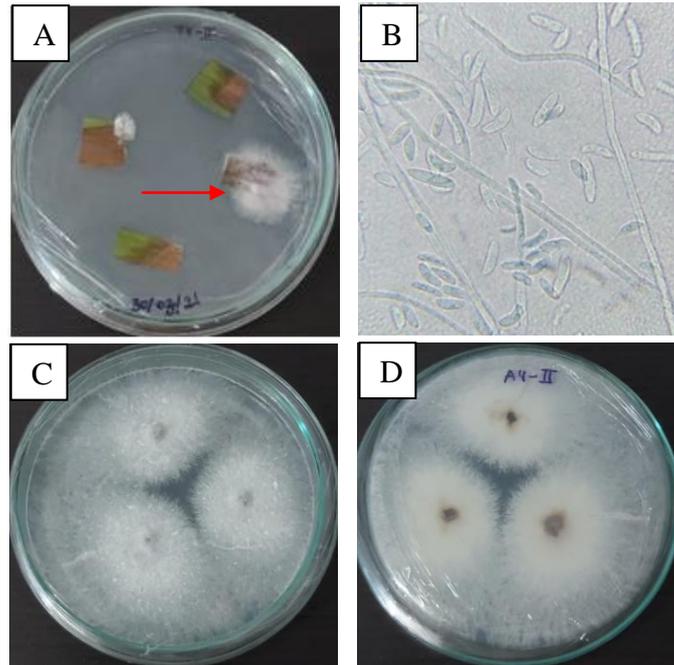


Figura 43. Cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) reaislada en medio PDA. A) Crecimiento de la cepa E1H-35 en muestras de hojas de la palma infectada B) Morfología de la cepa. C-D) Fotografías del anverso y reverso del cultivo.

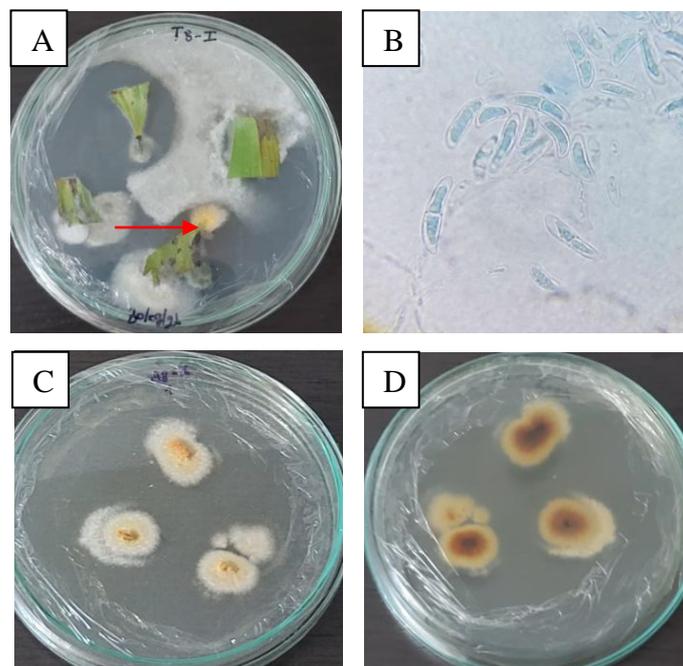


Figura 44. Cepa E1H-15 (*Fusarium solani*) reaislada en medio PDA. A) Crecimiento de la cepa E1H-15 en muestras de hojas de la palma infectada B) Morfología de la cepa. C-D) Fotografías del anverso y reverso del cultivo.

4.9. Pruebas de antagonismo con controles biológicos y químicos

Se probó la capacidad inhibitoria de 3 cepas fúngicas de *Trichoderma*, una cepa de levadura (*Saccharomyces*) y 3 fungicidas comerciales frente a tres cepas patógenas de *Fusarium*, seleccionadas por su capacidad infectiva en las pruebas de patogenicidad. Las cepas en confrontación presentaron mayores diferencias en su crecimiento radial respecto al control a partir del sexto y séptimo día de evaluación. Los resultados del crecimiento de las tres cepas de *Fusarium* en presencia de los diferentes controles biológicos y químicos se detallan en la Tabla 28.

En el análisis del porcentaje de inhibición de la cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) se observó diferencias significativas (valor $p=0,0001$) de su crecimiento frente a controles biológicos y químicos (Tabla 29). En la Tabla 30 se puede observar que el tratamiento químico con Himexazol y los tratamientos biológicos con *Trichoderma koningii* (cepa E1H-7) y *Trichoderma atroviride* (cepa E2H-3) influyeron en el crecimiento de la cepa E1H-35.

El análisis de inhibición de la cepa E1H-15 (*Fusarium solani*) reveló que existen diferencias significativas (valor $p=0,0001$) entre todos los tratamientos con controles biológicos y químicos (Tabla 31). Estas diferencias entre tratamientos revelaron que los controles biológicos con *Trichoderma koningii* (cepa E1H-7) y *Trichoderma atroviride* (cepa E2H-3) tuvieron mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento radial de la cepa E1H-15 (Tabla 32).

De la misma manera se observó diferencias significativas (valor $p=0,0001$) en las pruebas de antagonismo de la cepa E1H-39 (*Fusarium ambrosium*) frente a controles biológicos y químicos (Tabla 33). Con la prueba de Tukey (Tabla 34) se comprobó que los controles con *Trichoderma atroviride* (cepa E2H-3) y con Himexazol tuvieron una mayor capacidad inhibitoria en el crecimiento de la cepa E1H-39.

Tabla 28. Crecimiento radial y porcentaje de inhibición de cepas fúngicas en el séptimo día del bioensayo dual.

Código del tratamiento	Cepas patógenas	Antagonistas ^a	Crecimiento radial promedio del patógeno (cm)	Crecimiento radial promedio del control ^b (cm)	% de inhibición ^c
T1C1	T1: E1H-39	C1: <i>Trichoderma</i> sp.	2.55	2.85	9,94
T1C2		C2: <i>Trichoderma koningii</i>	1.32	2.85	53,80
T1C3		C3: <i>Trichoderma atroviride</i>	1.22	2.85	57,30
T1C4		C4: <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	2.10	2.85	26,30
T1C5		C5: Benomil	2.00	2.85	24,00
T1C6		C6: PCNB	2.77	2.85	2,92
T1C7		C7: Himexazol	1.02	2.85	64,30
T2C1	T2: E1H-35	C1: <i>Trichoderma</i> sp.	1.25	1.55	19,40
T2C2		C2: <i>Trichoderma koningii</i>	0.78	1.55	49,50
T2C3		C3: <i>Trichoderma atroviride</i>	0.72	1.55	53,80
T2C4		C4: <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	1.50	1.55	3,23
T2C5		C5: Benomil	1.47	1.55	5,38
T2C6		C6: PCNB	1.47	1.55	5,38
T2C7		C7: Himexazol	0.92	1.55	40,90
T3C1	T3: E1H-15	C1: <i>Trichoderma</i> sp.	2.60	2.80	7,14
T3C2		C2: <i>Trichoderma koningii</i>	2.40	2.80	14,30
T3C3		C3: <i>Trichoderma atroviride</i>	1.33	2.80	52,40
T3C4		C4: <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	2.13	2.80	23,80
T3C5		C5: Benomil	2.03	2.80	28,60
T3C6		C6: PCNB	2.23	2.80	20,20
T3C7		C7: Himexazol	1.30	2.80	53,60

^a Controles biológicos y químicos. ^b Crecimiento del hongo patógeno sin siembra dual. ^c Cultivos duales para inhibición del crecimiento del patógeno frente al antagonista.

Tabla 29. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	10679,33	6	1779,89	42,23	0,0001
Tratamientos	10679,33	6	1779,89	42,23	0,0001
Error	590,04	14	42,15		
Total	11269,37	20			

Tabla 30. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.

Tratamientos	Medias	n	E.E.	Resultado*
T1C7	64,33	3	3,75	A
T1C3	57,30	3	3,75	A
T1C2	53,80	3	3,75	A
T1C4	26,30	3	3,75	B
T1C5	23,97	3	3,75	B
T1C1	9,97	3	3,75	B C
T1C6	2,92	3	3,75	C

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0.05).

Tabla 31. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-15 (*Fusarium solani*) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	8857,99	6	1476,33	18,11	0,0001
Tratamientos	8857,99	6	1476,33	18,11	0,0001
Error	1141,18	14	81,51		
Total	9999,18	20			

Tabla 32. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-15 (*Fusarium solani*) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.

Tratamientos	Medias	n	E.E.	Resultado*	
T2C3	53,77	3	5,21	A	
T2C2	49,47	3	5,21	A	
T2C7	40,87	3	5,21	A	B
T2C1	19,36	3	5,21	B	C
T2C6	5,38	3	5,21	C	
T2C5	5,38	3	5,21	C	
T2C4	3,23	3	5,21	C	

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0.05).

Tabla 33. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-39 (*Fusarium ambrosium*) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	5842,02	6	973,67	33,94	0,0001
Tratamientos	5842,02	6	973,67	33,94	0,0001
Error	401,65	14	28,69		
Total	6243,67	20			

Tabla 34. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición de la cepa E1H-39 (*Fusarium ambrosium*) vs. controles biológicos y químicos en InfoStat.

Tratamientos	Medias	n	E.E.	Resultado*	
T3C7	53,57	3	3,09	A	
T3C3	52,37	3	3,09	A	
T3C5	28,57	3	3,09	B	
T3C4	23,80	3	3,09	B	
T3C6	20,23	3	3,09	B	C
T3C2	14,27	3	3,09	B	C
T3C1	7,14	3	3,09	C	

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0.05).

Finalmente, estos resultados muestran que el control biológico *Trichoderma atroviride* (cepa E2H-3) y el control químico Himexazol tuvieron una mayor capacidad antagonista sobre cada patógeno del presente estudio. En las Figuras 45, 46 y 47 se

muestran los controles biológicos y químicos enfrentados con las cepas E1H-35 (*Fusarium oxysporum*), E1H-15 (*Fusarium solani*) y E1H-39 (*Fusarium ambrosium*) respectivamente.

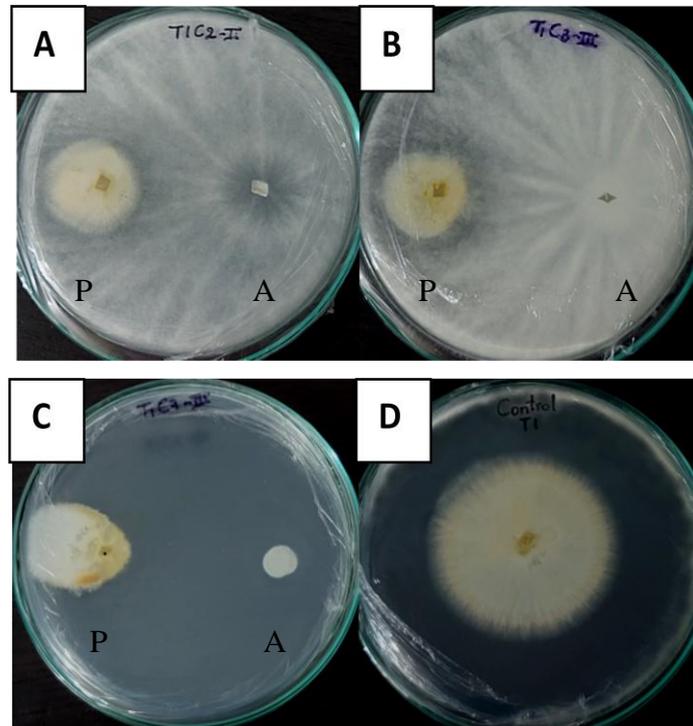


Figura 45. Pruebas de antagonismo cepa E1H-35 (*Fusarium oxysporum*) en medio PDA. A) Cepa E1H-35 (P) vs. *Trichoderma koningii* (A), B) Cepa E1H-35 (P) vs. *Trichoderma atroviride* (A), C) *Fusarium oxysporum* (P) vs. Himexazol (A), D) Control Cepa E1H-35.

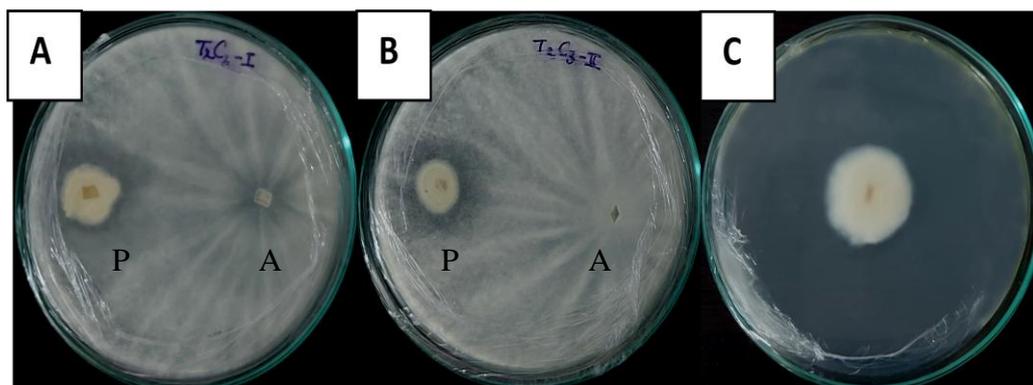


Figura 46. Pruebas de antagonismo de cepa E1H-15 (*Fusarium solani*) en medio PDA. A) Cepa E1H-15 (P) vs *Trichoderma koningii* (A), B) Cepa E1H-15 (P) vs *Trichoderma atroviride* (A), C) Control cepa E1H-15.

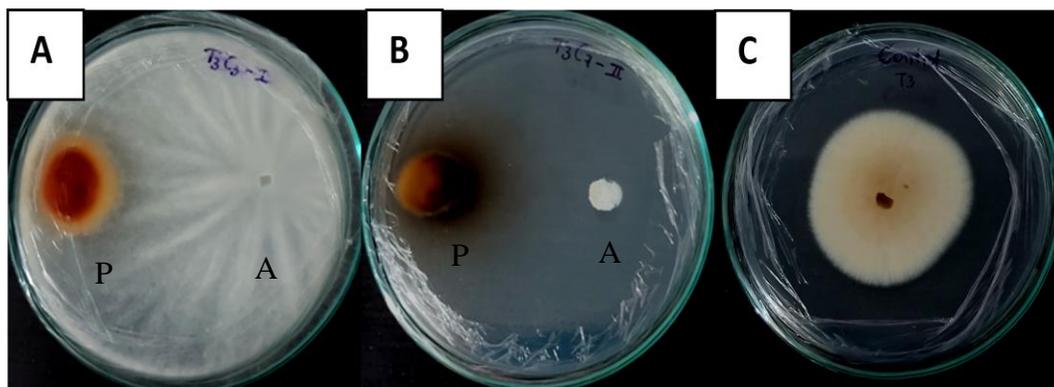


Figura 47. Pruebas de antagonismo de cepa E1H-39 (*Fusarium ambrosium*) en medio PDA. A) Cepa E1H-39 (P) vs *Trichoderma atroviride* (A). B) Cepa E1H-39 (P) vs Himexazol (A). C) Control cepa E1H-39.

4.10. Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles se determinó por el método Folin-Ciocalteu. La curva de calibración se preparó con ácido gálico ($R^2 = 0.992$) y mediante la ecuación de regresión lineal ($y = 0.101x - 0.083$) se calculó la concentración de fenoles totales (Tabla 35) de las muestras hojas de palma aceitera en todos los estadios.

Tabla 35. Valores obtenidos en la determinación de fenoles totales

Estadio	Muestras	Fenoles totales (mg/g)*
Sana	E0P1H	23.723
	E0P2H	19.762
	E0P3H	15.911
	E0P4H	19.416
	E0P5H	15.634
E1	E1P1H	25.723
	E1P2H	25.901
	E1P3H	32.446
	E1P4H	23.792
	E1P5H	24.104
E2	E2P1H	5.782
	E2P2H	6.168
	E2P3H	5.752
	E2P4H	5.010
	E2P5H	6.257

* Equivalentes de ácido gálico (GAE, mg de ácido gálico/g de extracto de la muestra)

El análisis estadístico realizado en el programa InfoStat demostró una diferencia estadística significativa (valor $p = 0.0001$) para la variable concentración de fenoles totales, resultando diferentes las medias de los tratamientos, como se observa en la Tabla 36.

Tabla 36. Análisis de la varianza para la variable concentración de fenoles totales en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	1086.89	2	543.45	69.25	0.0001
Tratamiento	1086.89	2	543.45	69.25	0.0001
Error	94.18	12	7.85		
Total	1181.07	14			

Al existir diferencias significativas entre las muestras, se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias. Se obtuvo una mayor concentración de fenoles totales en las muestras del primer estadio, por ello se sitúan en el mayor rango de significancia como se muestra en la Tabla 37.

Tabla 37. Prueba Tukey para la variable concentración de fenoles totales en InfoStat.

Muestras	Medias^a	n	E.E.	Resultado^b
E1	26.39	5	1.25	A
Sana	18.89	5	1.25	B
E2	5.79	5	1.25	C

^a Contenido medio de fenoles totales expresado en mg de ácido gálico/g de extracto de la muestra.

^b Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En la Figura 48 se puede observar los diferentes tratamientos de concentración de fenoles totales. La longitud de la barra representa la concentración de fenoles en cada estadio.

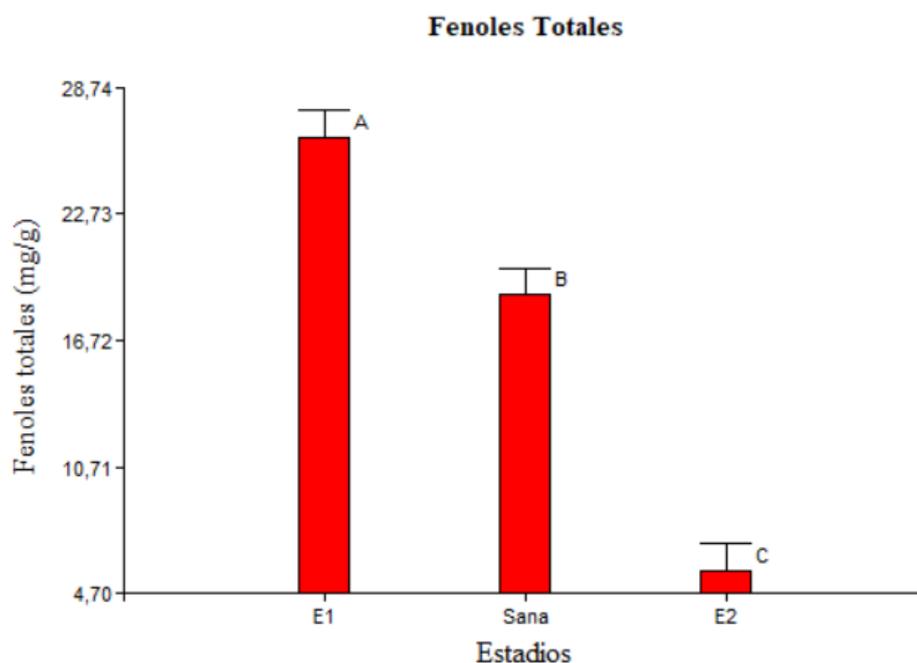


Figura 48. Concentración de fenoles totales. Concentración de fenoles en cada estadio.

4.11. Capacidad antioxidante

En la Tabla 38 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras con PC y sanas mediante los métodos FRAP, ABTS y DPPH. Los valores del porcentaje de inhibición de las muestras variaron entre el 35.69 y 60.69% para el ensayo con ABTS y de 40.65 a 75.53% para el ensayo con DPPH. Los resultados del ensayo con FRAP estuvieron en el rango de 0,016 y 0,097.

4.11.1. Método FRAP

La ecuación ($y = 0.0434x - 0.0117$) obtenida de la curva de calibración con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($R^2 = 0.998$), se utilizó para el cálculo de la capacidad antioxidante FRAP (Tabla 38) de las muestras de hojas de palma aceitera. Los resultados se expresaron en μmol equivalente $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por gramo sólido soluble.

Tabla 38. Evaluación de la capacidad oxidante de los extractos de palma aceitera mediante los métodos FRAP, ABTS y DPPH.

Extractos	Muestras	FRAP ($\mu\text{mol/g}$) ^{a,*}	ABTS ($\mu\text{mol/g}$) ^{b,*}	DPPH ($\mu\text{mol/g}$) ^{b,*}
Sana	E0P1H	56.007	35.696	73.78
	E0P2H	57.044	39.691	73.74
	E0P3H	57.666	40.077	73.01
	E0P4H	55.569	60.696	74.39
	E0P5H	54.647	59.407	74.96
Estadio 1	E1P1H	57.666	46.521	75.20
	E1P2H	57.873	44.716	75.53
	E1P3H	57.459	47.552	75.45
	E1P4H	56.260	60.696	75.28
	E1P5H	56.260	59.407	75.12
Estadio 2	E2P1H	14.647	34.794	40.65
	E2P2H	17.297	32.474	40.77
	E2P3H	15.177	38.273	60.89
	E2P4H	23.795	38.015	67.44
	E2P5H	24.694	36.985	67.32

* Los valores representan el promedio de tres repeticiones.

^a μmol equivalente $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por gramo sólido soluble.

^b Porcentaje de inhibición de la formación de radicales ABTS o DPPH, expresado como μmol equivalentes de Trolox por gramo peso seco de muestra ($\mu\text{mol ET/g}$ de PS).

El análisis estadístico realizado en el programa InfoStat demostró que existe una diferencia significativa (valor $p = 0.0001$) de poder reductor en los extractos evaluados por el método FRAP, como se observa en la Tabla 39

Tabla 39. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método FRAP en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	4695.38	2	2347.69	281.81	0.0001
Tratamientos	4695.38	2	2347.69	281.81	0.0001
Error	99.97	12	8.33		
Total	4795.35	14			

Al existir diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias entre tratamientos. Se obtuvo que las muestras del primer estadio y sanas tuvieron una mayor actividad antioxidante a diferencia de las muestras en segundo mediante el método FRAP, así pues se sitúan en el mayor rango de significancia como se muestra en la Tabla 40.

Tabla 40. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método FRAP en InfoStat.

Tratamientos	Medias ^a	n	E.E.	Resultado*
Estadio 1	57.10	5	1.29	A
Sana	56.19	5	1.29	A
Estadio 2	19.12	5	1.29	B

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

^a Capacidad antioxidante media presentada como μmol equivalente $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por gramo de muestra.

En la Figura 49 se puede observar los diferentes tratamientos en la evaluación de la actividad antioxidante por el método FRAP. La longitud de la barra representa la concentración μmol de Fe^{2+} por g de muestra en la actividad antioxidante por el método FRAP.

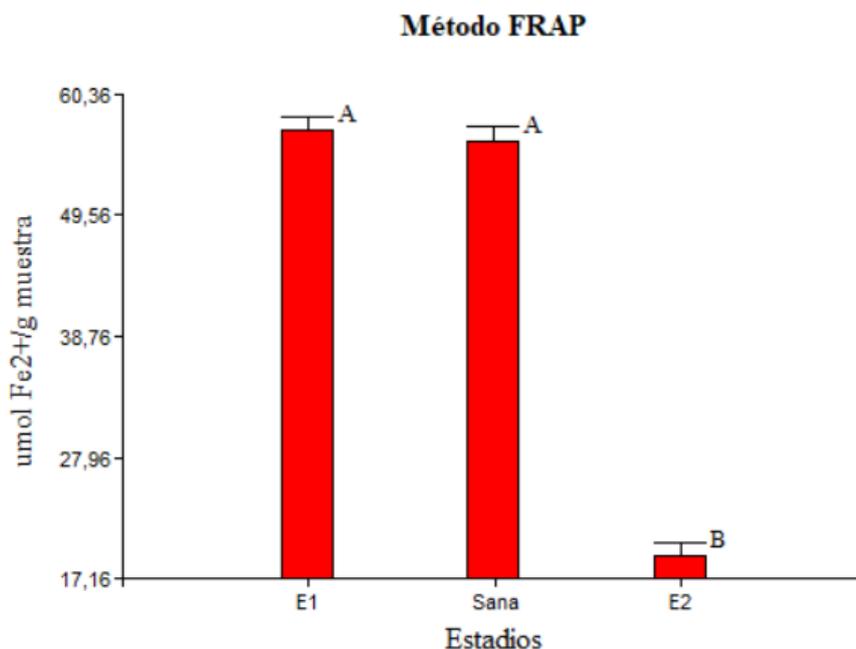


Figura 49. Evaluación de la actividad oxidante por el método FRAP.

4.11.2. Método DPPH

El cálculo de la capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH, de las muestras hojas de palma aceitera sanas y en los dos estadios de la PC, se muestra en la Tabla 38. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo peso seco de muestra ($\mu\text{mol/g}$).

El análisis estadístico realizado en el programa InfoStat demostró una diferencia estadística significativa (valor $p = 0.0029$) para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método DPPH, como se observa en la Tabla 41.

Tabla 41. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método DPPH en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	1237.39	2	618.69	9.88	0.0029
Tratamientos	1237.39	2	618.69	9.88	0.0029
Error	751.07	12	62.59		
Total	1988.46	14			

Al existir una diferencia significativa entre los extractos, se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias entre tratamientos. Se obtuvo que las muestras del primer estadio y sanas tuvieron un mayor porcentaje de inhibición en comparación con las muestras del estadio 2, por lo que se sitúan en el mayor rango de significancia como se muestra en la Tabla 42.

Tabla 42. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método DPPH en InfoStat.

Tratamientos	Medias ^a	n	E.E.	Resultado*
Estadio 1	75.32	5	0.01	A
Sana	74.22	5	0.01	A
Estadio 2	52.97	5	0.01	B

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

^a Porcentaje de inhibición de la formación de radicales DPPH, expresado como μmol equivalentes de Trolox por gramo peso seco de muestra ($\mu\text{mol/g}$).

En la Figura 50 se puede observar los diferentes tratamientos en la evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH. La longitud de la barra representa el porcentaje de inhibición en cada estadio.

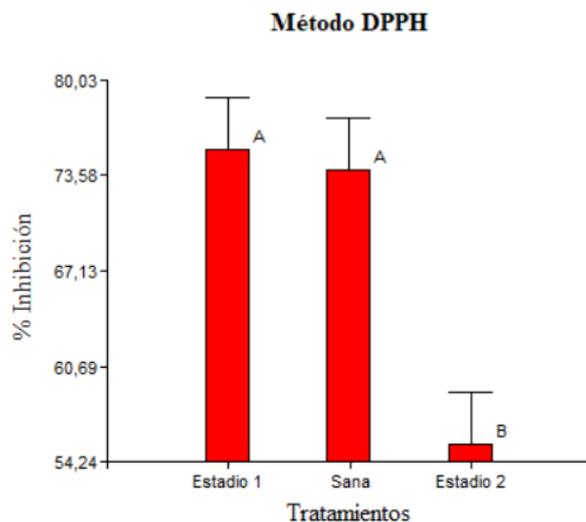


Figura 50. Evaluación de la actividad oxidante por el método DPPH.

4.11.3. Método ABTS

La capacidad antioxidante por inhibición del radical ABTS, de las muestras sanas y enfermas con PC, se muestra en la Tabla 38. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo peso seco de muestra ($\mu\text{mol/g}$). El análisis estadístico realizado en el programa InfoStat demostró una diferencia estadística significativa (valor $p = 0.0312$) para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método ABTS, resultando diferentes las medias de los tratamientos, como se observa en la Tabla 43.

Tabla 43. Análisis de la varianza para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método ABTS en InfoStat.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Cuadrado de la media	F-Valor	p-Valor
Modelo	647.39	2	323.69	4.69	0.0312
Tratamientos	647.39	2	323.69	4.69	0.0312
Error	827.70	12	68.98		
Total	1475.09	14			

Como existió diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias entre tratamientos. Se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición en las muestras del primer estadio y sanas en comparación con las muestras del segundo estadio, con lo cual se sitúan en el mayor rango de significancia como se muestra en la Tabla 44.

Tabla 44. Prueba Tukey para la variable porcentaje de inhibición en la actividad antioxidante por el método ABTS en InfoStat.

Tratamientos	Medias	n	E.E.	Resultado
E1	51.78	5	3.71	A
Sana	47.11	5	3.71	A
E2	36.11	5	3.71	B

* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En la Figura 51 se puede observar los diferentes tratamientos en la evaluación de la actividad antioxidante por el método ABTS. La longitud de la barra representa el porcentaje de inhibición en cada estadio.

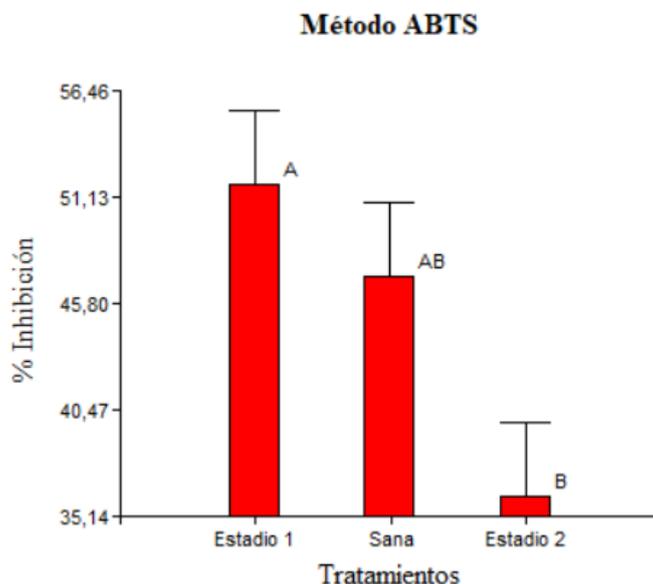


Figura 51. Evaluación de la actividad oxidante por el método ABTS.

5. DISCUSIÓN

5.1. Perfil taxonómico fúngico mediante NGS

Para el análisis de la comunidad microbiana de las plantas enfermas, se consideraron los dos primeros estadios ya que en las últimas etapas de la enfermedad existió una invasión de microorganismos oportunistas, haciendo complicada la discriminación del agente causal. De acuerdo a De Assis *et al.* (2018) [111], el avance de la enfermedad genera cambios en la comunidad fúngica que se evidencia por la selección de ciertas especies, de esta manera la composición de la comunidad dependerá del primer microorganismo establecido en las primeras etapas de la enfermedad, puesto que la producción de metabolitos facilitarán o impedirán el desarrollo de nuevas especies que quieran llegar más adelante.

Después de varias décadas desde que se registró por primera vez la PC en palmas aceiteras en Ecuador, la enfermedad sigue afectando a muchos cultivos y los estudios llevados a cabo no han podido determinar el agente causal de la enfermedad, pese a que en Colombia se ha determinado que el oomiceto *Phytophthora palmivora* es el responsable de la PC [2][50][51][153][154]. Otro estudio realizado en plantaciones de Brasil con síntomas similares a la PC tampoco evidenció la presencia de *Phytophthora* [111].

Para verificar la presencia del oomiceto se utilizó los primers ITS3oo/ITS4 descritos por Riit [155][156], así como los primers COX II empleados por Maizatul [117] para la identificación de *P. palmivora* en hojas infectadas de palma de aceite en Colombia. No obstante, en ninguna de las muestras se obtuvo amplificación para el género *Phytophthora*, a diferencia del control positivo que amplificó para los primers ITS3oo/ITS4 y COX II. Del mismo modo, el análisis de la región ITS con los primers universales ITS4/ITS3 no evidenció la presencia del género *Phytophthora* en las muestras procesadas por NGS.

Como la composición microbiana juega un importante rol en el desarrollo de la PC, es necesario evaluar las comunidades fúngicas para explicar las diferencias entre los estadios de la PC y plantas sanas, así como los posibles candidatos patógenos causales de la enfermedad. En la caracterización de la comunidad fúngica mediante secuenciación masiva del gen ITS se obtuvieron 871243 lecturas de buena calidad, con una dominancia del filo Ascomycota tanto en plantas sanas como enfermas al igual que los resultados obtenidos por De Assis *et al.* [111] en sus estudios de la comunidad fúngica en palma aceitera con la enfermedad.

En las plantas sanas el género más abundante fue *Kazachstania* (81.81%), un miembro de la familia Saccharomycetaceae que está estrechamente relacionada con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con buenas capacidades fermentativas y por ello se la ha aprovechado en la producción de vino [157], por ende su presencia y abundancia podría ser considerado un indicador de palma aceiteras sanas. Estos resultados contrastan con los De Assis *et al.* [111], que en plantas aparentemente sanas encontró una mayor participación del género *Pyrenochaetopsis* y de otro grupo no clasificado, mientras que en esta investigación el género *Pyrenochaetopsis* estuvo presente en bajas cantidades en las plantas enfermas.

En todas las muestras del primer estadio fueron más representativos los géneros *Fusarium* (20.73%) y *Coprinopsis* (13.40%), mostrándose como dominante el género *Fusarium* al igual que los resultados obtenidos por De Assis *et al.* [111]. En el segundo estadio en contraste con el primer estadio, existió un bajo porcentaje de *Fusarium* (0.23%) y una mayor presencia de los géneros *Antrodia* (67.79%) seguido por un género clasificado a nivel de la familia Didymellaceae (36.03%). De acuerdo con estos resultados, en el diseño de estrategias de aislamiento se incluyeron medios de cultivo para *Fusarium*, un género patógeno involucrado en la pudrición y marchitez en una variedad de plantas [158].

La disminución de *Fusarium* en el segundo estadio podría deberse a la presencia de otros microorganismos, cuya colonización podría darse por una alteración biológica del huésped, bien sea por la capacidad de algunos microorganismos simbiotes de producir

proteínas efectoras que suprimen o alteran proteínas del huésped hasta la capacidad de transformar el metabolismo del huésped. Estas alteraciones finalmente resultan ser beneficiosas o perjudiciales para ciertos grupos de microorganismos, provocando cambios en la estructura del microbioma [159].

En este estudio no se consideró, para las pruebas de patogenicidad, a los géneros *Coprinopsis* porque es un hongo endófito [160], ni a *Lasiodiplodia* dado que fue abundante solo en la muestra E1P3C. Tampoco se consideraron a *Paracremonium* y *Arthrobotrys* encontrados en bajos porcentajes y además porque correspondieron a hongos sin relación con la PC de acuerdo a investigaciones sobre la composición microbiana del cogollo con PC [27][28][111].

Por otra parte, de acuerdo a Lombard 2014 [161] las especies de *Paracremonium* estarían más asociadas a infecciones humanas, mientras que el género *Arthrobotrys* pertenece a hongos nematófagos que en presencia de nemátodos tienen la capacidad de pasar de un estado safrófito a una etapa depredadora de nemátodos produciendo metabolitos [162].

Con respecto a la riqueza de especies fúngicas se pudo observar un mayor número de taxones en las muestras sanas respecto a las muestras enfermas, en las cuales disminuyó del primer al segundo estadio de PC. Sin embargo, los índices de Shannon e Inverso de Simpson indicaron una mayor diversidad en las muestras del primer estadio de PC en comparación con las muestras sanas y del segundo estadio, sugiriendo que las muestras del primer estadio tienen una mayor diferenciación en la composición de taxones.

En el análisis de la composición de comunidades fúngicas entre estadios se pudo evidenciar diferencias en la composición entre comunidades fúngicas, donde las muestras analizadas formaron agrupaciones por estadio según los índices Bray-Curtis y Unifrac ponderado que toman en cuenta los índices de disimilitud basados en abundancias relativas y cuyas diferencias significativas se confirmaron con el análisis de permanova.

Las diferentes respuestas en las abundancias observadas en este estudio podrían estar relacionadas con diferencias en las estrategias de estilo de vida de hongos y bacterias [163][164] o incluso una predominancia del hongo patógeno puede deberse a que compite con otros hongos por el mismo nicho ecológico [165].

5.2. Perfil taxonómico bacteriano mediante NGS

De acuerdo a la bibliografía revisada no se encontró estudios previos sobre la comunidad bacteriana presente en el cogollo de palma aceitera con PC, por tal motivo, se analizó la diversidad bacteriana presente en plantas sanas y en cada estadio de la PC. La secuenciación masiva del gen 16S generó 408663 secuencias de buena calidad que correspondieron a 140499 secuencias de plantas sanas, 143063 secuencias del primer estadio y 125101 secuencias del segundo estadio.

En la caracterización de la comunidad bacteriana a nivel de género se encontró en plantas sanas una mayor frecuencia de *Paenibacillus* (31.75%), a diferencia del primer y segundo estadio con bajos porcentajes de 0.71% y 0.84% respectivamente. El género *Paenibacillus* es miembro de la familia Paenibacillaceae del filo Firmicutes, el cual deriva del género *Bacillus* pero que fue separado sobre la base de las secuencias del gen ARNr 16S en otro grupo al ser filogenéticamente distinto [166]. Las especies de este género son de naturaleza ubicua que desempeñan un papel importante en la industria y agricultura al influir en la fijación del nitrógeno, crecimiento de plantas e inhibición de patógenos [167][168][169][170], de ahí que su presencia se podría considerar como indicador de plantas sanas.

En las muestras del primer estadio de PC se identificó una mayor presencia de un miembro no identificado de las Enterobacteriaceae (17.13%), a diferencia del segundo estadio donde fue más abundante el género *Bacteroides* (10.88%) y el miembro no identificado de las Enterobacteriaceae (7.08%). En esta investigación no se identificó al género *Erwinia*, que es una de las bacterias asociadas a la PC de acuerdo a algunas investigaciones.

En el análisis de riqueza de especies bacterianas se pudo observar un menor número de taxones en las muestras sanas (208 taxones en promedio) a diferencia del primer estadio (794 taxones en promedio) y segundo estadio (860 taxones en promedio). No obstante, en base a los índices de Shannon e Inversa de Simpson existió una mayor diversidad de especies en el segundo estadio a diferencia de las plantas sanas donde fue menor esta diversidad.

Además, las plantas sanas presentaron un mayor conteo de taxones de hongos que de bacterias. De acuerdo a Sundin [171], esta diferencia puede deberse a que en condiciones ambientales óptimas aumenta la tasa de crecimiento de las poblaciones bacterianas y por ende aumentan los niveles de infección en la planta. Tales condiciones pueden darse con la fabricación de productos que benefician a patógenos que se encuentran compitiendo por espacio así como la alteración de las funciones biológicas de las plantas, producto del ataque de patógenos. Wemheuer [172] en sus investigaciones sobre comunidades endófitas bacterianas y fúngicas, encontró diferencias en las abundancias de hongos y bacterias respecto a los factores de afectación de las plantas de *Acer campestre* y sitios de muestreo.

Por otra parte, Tondo manifiesta [173] que las bacterias deben superar la barrera de estrés oxidativo para colonizar la planta huésped, la cual es puesta por la planta al producir especies reactivas de oxígeno (ROS) para prevenir el ingreso y crecimiento de patógenos bacterianos, por tanto esta podría ser otra posible razón del bajo número de taxones en plantas sanas respecto al avance de la enfermedad.

En el análisis de diversidad microbiana de comunidades entre plantas sanas y con PC, se obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre plantas sanas y en los dos estadios de la PC de acuerdo a la prueba permanova, pese a que en el análisis de los índices de similitud no fue muy evidente la agrupación de todas las muestras de acuerdo a su estadio.

5.3. Frecuencia de aislamiento de la comunidad fúngica mediante técnicas dependientes de cultivo

Coincidiendo con el análisis molecular, *Fusarium* fue el género mayormente obtenido por las técnicas de cultivo dependiente en las muestras con PC. En el estadio 1 se encontraron 47 cepas del género *Fusarium*, de los cuales se identificó molecularmente a cepas de *F. solani*, *F. cyanescens*, *F. oxysporum*, *F. sacchari*, *F. ferrugineum* y *F. ambrosium* (3,13%), además de 5 cepas del género *Trichoderma* y cepas del género *Thielaviopsis*. A diferencia del estadio 2 donde se encontraron 23 cepas del género *Fusarium* cuyas especies identificadas molecularmente fueron *F. solani*, *F. cyanescens* y *F. ambrosium* y además se identificó una cepa del género *Trichoderma*. En ambos estadios la especie común y más abundante fue *F. solani*.

Estos resultados coinciden con la investigación de Rivas [28] en el cantón San Lorenzo de la provincia de Esmeraldas, donde identificó al género *Fusarium* con una abundancia del 85,71%, cuyas especies *F. oxysporum* (50 %), *F. proliferatum* (33,33%) y *F. solani* (16,67) fueron las más representativas. Además, evidenció la presencia de otros géneros como *Trichoderma* (6,34%), *Diplodia* (1,58%), *Chalaropsis* (3,17%), *Colletotrichum* (1,58%) y *Pestalotiopsis* (1,58%).

Igualmente la relación de diversidad fúngica encontrada en esta investigación concuerda con lo observado por Sarria 2008 [27], que identificó en diferentes estadios de infección y con mayor frecuencia a *Fusarium* spp. (37,83%), *Colletotrichum* spp. (11,51%), *Basidiomycete* spp. (4,61%), *Pestalotia* spp. (8,22%), *Erwinia* spp. (4,93%), *Rhizoctonia* spp. (3,29%), *Alternaria* spp. (2,63%), *Phytophthora* spp. (2,30%), *Thielaviopsis* sp. (1,64%) y *Curvularia* spp. (1,64%). Al igual que Ronquillo [33] que identificó a *Fusarium* spp. (36,59%), *Colletotrichum* spp. (8,43%), *Pestalotia* spp. (7,23%), *Curvularia* spp. (6,02%) y *Alternaria* spp. (4,82%), y Buitrago [174] que descubrió en mayor frecuencia a *F. solani* (62,5%) y *Pestalotia* spp (50,0%).

De las muestras de cogollo sembradas tanto en medios generales (PDA) como en medios selectivos para oomicetos [2][124][126][127], se seleccionaron colonias blancas

con textura algodonosa típicas del género *Phytophthora* para observar principalmente la presencia de hifas no septadas y esporangios ovalados [24][175]. Sin embargo, no fueron notorias las características morfológicas del grupo oomicetos y los análisis de secuenciación confirmaron la ausencia de oomicetos en las muestras evaluadas. Las especies de *Phytophthora* se caracterizan por ser microorganismos hemibiotróficos y su aislamiento en lesiones avanzadas puede ser difícil de conseguir con la presencia de patógenos oportunistas, siendo más notoria su presencia en los bordes externos de las lesiones [50].

5.4. Frecuencia de aislamiento de la comunidad bacteriana mediante técnicas dependientes de cultivo

Mediante técnicas dependientes se identificó molecularmente a 5 aislados de las muestras en primer y segundo estadio de la PC, teniendo una baja prevalencia en comparación al número de cepas obtenidas de hongos. De acuerdo a Rastogi y *col* (2010) [176] que analizaron la abundancia de bacterias totales en hojas de lechuga, encontraron que solo el 0.1 - 8.4% de la comunidad bacteriana total fue cultivable. Otros estudios indican que la porción cultivable de bacterias en la filósfera se encuentra a menudo en el rango de 0.1 - 5% [66].

Los aislados bacterianos no se consideraron en los ensayos de patogenicidad por su baja frecuencia en el primer estadio en comparación a la frecuencia de hongos y porque en la literatura se ha reportado a las bacterias, especialmente a *Erwinia*, como agentes secundarios de la PC porque no han reproducido la enfermedad en las pruebas de patogenicidad [4].

Las bacterias identificadas de esta investigación fueron bacilos gramnegativos, donde las cepas E1B-1 (*Escherichia coli*), E2B-3 (*Citrobacter amalonaticus*) y E1B-4 (*Citrobacter* sp.) tuvieron la capacidad de macerar el tejido de la papa, una importante característica de bacterias de la especie *Erwinia carotora* que hidrolizan la pectina para obtener oligogalacturónidos como fuente de carbono [62].

5.5. Pruebas de patogenicidad

Las plantas de palma aceitera en invernadero presentaron manchas cloróticas con lesiones necróticas similares a la PC. Las lesiones necróticas se presentaron mayormente en el sitio de inoculación y en el caso de los tratamientos con las cepas E1H-35 (*F. oxysporum*), E1H15 (*F. solani*) y E1H-39 (*F. ambrosium*) se presentaron además lesiones necróticas en el tercio superior de las hojas inoculadas. Resultados similares obtuvo Maizatul 2019 [117] y Mohamed 2019 [177], que observaron lesiones marrones localizadas en sitios de inoculación, las cuales fueron equiparables a la forma no letal de la enfermedad.

Además, investigaciones realizadas por Cenipalma en Colombia observaron la presencia de necrosis en los folíolos de las plantas y además evidenciaron que la pudrición de flecha se inició con una lesión rodeada por un halo naranja que fue oscureciéndose rápidamente hasta secarse y permanecer solamente los residuos de las nervaduras secundarias [49]. También De Franqueville [4] indicó que generalmente los primeros síntomas se manifiestan con clorosis en las hojas jóvenes, seguida de una podredumbre húmeda en los folíolos de las lanzas desde donde se propaga por contacto entre folíolos y finalmente se extiende hacia el meristemo.

En esta investigación se observó síntomas de infección mediante los tres métodos de inoculación (punción, contacto y goteo). Sin embargo el tratamiento con daño mecánico (punción) presentó diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la escala de severidad de síntomas externos desarrollada por Cenipalma [137][138][139][140][141]. Estos resultados coinciden con Maizatul 2019 [117] que estableció la necesidad de herir la lanza para producir la infección y contrastan con los resultados de Sarria *et al.* 2016 [26] que reprodujo la infección sin causar heridas en la lanza.

Perthuis [178] en sus investigaciones observó una mayor prevalencia del insecto *Scaptocoris minor* Berg (Heteroptera, Cydnidae) en plantas con PC y lo consideró un potencial vector de la PC. Por otra parte, Martínez [179] identificó a *Leucothyreus* sp. (Coleoptera, Scarabaeidae) un insecto defoliador que se alimenta de la palma aceitera.

También el insecto *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera, Curculionidae) que constituye una plaga directa de la palma ya que se lo ha asociado con la PC [180][181]. En la naturaleza los daños mecánicos en palmas aceiteras sanas podrían darse por insectos que se alimentan de la planta causando daño en los tejidos y que facilitan la infección con el patógeno.

En la pruebas de patogenicidad, un inóculo inicial de 200 μ L de suspensión de 10^7 esporas/mL de cada hongo permitió establecer la infección en las plantas. De acuerdo a Maizatul 2019 [117], la cantidad y viabilidad del inóculo primario es determinante para una infección exitosa, mientras que un inóculo secundario determinará la gravedad de la infección y su propagación.

Solamente las plantas inoculadas con las cepas E1H-35 (*F. oxysporum*), E1H15 (*F. solani*) y E1H-39 (*F. ambrosium*) presentaron clorosis con lesiones necróticas que fueron evolucionando con los días. En consecuencia, se consideraron a esos hongos como los de mayor capacidad infectiva de acuerdo a los análisis estadísticos. Los primeros síntomas fueron evidentes a los 40 días de inoculación con las cepas E1H-35 (*F. oxysporum*) y E1H15 (*F. solani*), mientras que la cepa E1H-39 (*F. ambrosium*) a los 50 días presentó una evolución de las lesiones necróticas. En todos los casos las lesiones necróticas no avanzaron hasta el cogollo.

La edad de la planta podría ser un factor importante para el progreso de la enfermedad, lo que explicaría que en este estudio las lesiones necróticas no avanzaran hacia las yemas de la planta, ya que las palmas usadas en esta investigación tuvieron seis meses de edad. Munné [182] en sus trabajos con *Cistus clusii*, observó un aumento progresivo del estrés oxidativo en los cloroplastos a medida que las plantas envejecían y que ocasionaba una reducción de la fotosíntesis con daño de las funciones biológicas de las plantas.

También se presume que el desarrollo de los síntomas pudo estar influenciado por las condiciones ambientales, pues en la temporada de mayor humedad y lluvia los síntomas fueron evidentes. En Colombia se ha observado que la pudrición del cogollo se ha

desarrollado de diferentes maneras en distintas partes del país, donde el progreso de la enfermedad ha sido más rápido en zonas con mucha lluvia y alta humedad relativa durante periodos prolongados [51].

Por otro lado, el uso de bolsas plásticas permitió conservar por más tiempo la humedad en las plantas, favoreciendo el desarrollo de patógenos fúngicos en las hojas. Las temperaturas fluctuantes pueden hacer a las plantas más susceptibles a un patógeno en particular e igualmente los mecanismos de virulencia de patógenos que infectan tejidos aéreos están influenciados por la temperatura, lluvia así como el porcentaje y duración de humedad relativa [183].

5.6. Evaluación de antagonismo

Las estrategias de control basadas en el uso extensivo de fungicidas muchas veces acarrear problemas de resistencia fúngica en algunos componentes activos del producto, además de lograr perturbar y contaminar el ecosistema. Por eso, el uso de controles biológicos constituye un método ecológicamente amigable para el tratamiento y control de enfermedades. En este estudio los ensayos de antagonismo con los controles biológicos *Trichoderma atroviride* (cepa E2H-3) y *Trichoderma koningii* (cepa E1H-7) mostraron una mayor eficiencia al enmascarar por completo al patógeno y detener su crecimiento, a diferencia de las cepas *Trichoderma* sp. (C1) y *Saccharomyces* (C4) que presentaron una menor actividad microparasitaria en el trayecto de una semana.

La cepa E2H-3 (*T. atroviride*) fue la que obtuvo un mayor porcentaje de inhibición (52.37 - 57.30%) en el crecimiento de las cepas E1H-35 (*F. oxysporum*), E1H15 (*F. solani*) y E1H-39 (*F. ambrosium*). De la misma manera *Trichoderma koningii* ha resultado un buen antagonista contra algunas cepas de *Fusarium* sp. [184]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hewedy *et. al.* 2019 [185], donde los aislados de *Trichoderma* inhibieron significativamente el crecimiento de *F. oxysporum* desde un 35.71 a 85.75% de inhibición.

El género *Trichoderma* es el más utilizado como biofungicida debido a su actividad antagonista contra una amplia gama de microorganismos, donde su actividad micoparásita está atribuida a una competencia por nutrientes y a producción de enzimas degradadoras de la pared celular y antibiosis. Además, muchas especies de *Trichoderma* resultan resistentes al aumento de los niveles de H₂O₂, producto de la actividad de la glucosa oxidasa, en comparación de *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae* [186].

La actividad micoparásita de *Trichoderma* incluye el reconocimiento molecular del patógeno fúngico (huésped) y una unión directa mediante un enrollamiento de las hifas alrededor del hospedador fúngico, lo que origina la producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios necesarios para matar al patógeno [97]. De acuerdo a algunos investigadores [187][188], los microorganismos en determinadas situaciones de competencia por espacio o nutrientes, tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de varias especies de fitopatógenos.

En el proceso de enmascaramiento de *Trichoderma* a *Fusarium*, la pigmentación del patógeno fue más oscura. De acuerdo a Nosanchuk *et al.* [189] y Eisenman [190], la melanina es un pigmento que en los hongos constituye un mecanismo de defensa contra condiciones ambientales y favorece su virulencia al proporcionarle resistencia frente a mecanismos antimicrobianos.

Chen 2021 [191] observó que bajo condiciones de monocultivos consecutivos la abundancia de hongos patógenos como *F. oxysporum* fue mayor en comparación a *Trichoderma*, lo que desencadenó la represión de siete genes relacionados con la defensa de la planta y causó su infección. De igual manera Peix 2001 [192] y Zhao 2003 [193], cuyas investigaciones en plantas de tomate infectadas con *Pseudomonas syringae* y de frijol infectadas con *Burkholderia cepacia* presentaron la represión de genes, sugiriendo que la infección con patógenos reduce el mecanismo de defensa de la planta. De manera que, el uso prolongado de monocultivos de palma aceitera en la provincia de Esmeraldas podría ser la principal causa del aumento de patógenos que ocasionarían la rápida diseminación de la PC en los cultivos.

5.7. Concentración de fenoles y capacidad antioxidante

El mayor contenido de fenoles se obtuvo de extractos metanólicos de hojas en primer estadio de PC (26.393 mg GAE/g de muestra, valor promedio) en comparación con las muestras de hojas sanas (17.681 mg GAE/g de muestra, valor promedio) y del segundo estadio de PC (5.794 mg GAE/g de muestra, valor promedio). Sería adecuado identificar los componentes fenólicos presentes en el primer estadio de PC y analizar su efecto en plantas con PC, ya que los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que desempeñan un papel clave como defensa de la planta.

Estos metabolitos contienen varios grupos como ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, que dependiendo de su solubilidad pueden encontrarse de forma libre o esterificados [194], y su determinación se fundamenta en la capacidad de reducir ciertos ácidos del reactivo Folin-Ciocalteu en presencia de compuestos fenólicos de los extractos de la planta [195].

Debido al mayor contenido de fenoles en el primer estadio de PC, se presume que existió una mayor resistencia a la invasión de patógenos. Con el avance de la enfermedad la resistencia a patógenos se fue perdiendo, posiblemente por la necrosis y pérdida de hojas, las mismas que constituyen el órgano productor de metabolitos de defensa en la planta. Los fenoles son sintetizados en la hoja, donde se encuentran en mayor concentración, por lo cual una mayor concentración contribuye a una mayor actividad antimicrobiana [196][197].

Además, los compuestos fenólicos podrían estar involucrados en la cascada de captura de H_2O_2 [198], una de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que en altas concentraciones ejerce un efecto tóxico sobre la célula provocando estrés oxidativo[199]. Como resultado, si la cantidad de antioxidantes no es suficiente para neutralizar las ROS, ocurrirá la oxidación de biomoléculas, como la peroxidación de lípidos, daño de proteínas, oxidación de nucleótidos de ADN y ARN, inhibición de enzimas y la activación de la apoptosis [199].

Se observó que los extractos metanólicos de las hojas de palma presentaron un poder reductor de los radicales FRAP, ABTS y DPPH, demostrando que existe una diferencia entre la capacidad antioxidante de plantas sanas y en cada estadio de la PC como resultado de perturbaciones metabólicas. Tales perturbaciones pueden causar la formación de radicales libres, que son moléculas inestables con uno o más electrones desapareados, y tienen un rol importante en procesos biológicos con la capacidad de reaccionar con el ADN y dañarlo. Así pues, los antioxidantes actúan como un sistema de defensa dentro de la planta al ayudar a minimizar el daño causado por radicales libres debido a su capacidad de donar electrones (agentes reductores) [200].

El ensayo FRAP es un método que mide directamente los antioxidantes en una muestra en comparación con los métodos DPPH y ABTS que miden la inhibición de los radicales libres [201]. Los valores del ensayo FRAP fueron mayores en las muestras del primer estadio (57.66 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ muestra) y en sanas (56.18 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ muestra) respecto a las muestras del segundo estadio (19.12 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ muestra). Es decir, que los extractos orgánicos polares de la palma aceitera sana y en primer estadio de PC presentaron una mayor concentración de antioxidantes con la capacidad de donar electrones al Fe^{3+} para convertirlo en Fe^{2+} [201], demostrando que un mayor FRAP es proporcional a una mayor capacidad reductora sobre Fe^{3+} .

Por otra parte, la evaluación de la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS evidenciaron una buena capacidad de captación de radicales DPPH y ABTS en los extractos metanólicos de muestras sanas y en primer estadio de PC (ABTS: 47.11% sanas y 51.77% primer estadio; DPPH: 74% sanas y 75.32% primer estadio). De acuerdo a investigaciones de Sasidharan *et. al.* [92], los extractos metanólicos de hojas de palma aceitera sanas presentan buenas capacidades antioxidantes.

Según Dumanović [199], las plantas son ricas en compuestos antioxidantes, siendo los más destacados el ascorbato (se encuentra principalmente en hojas), glutatión, fenoles, tocoferoles, tocotrienoles y carotenoides liposolubles. Por tanto, sería importante determinar los compuestos antioxidantes de las muestras de palmas sanas y del primer

estadio de PC, con la finalidad de aprovecharlo como un posible tratamiento abiótico de la enfermedad.

6. CONCLUSIONES

- Se estandarizó un protocolo de fácil manejo y económico, para la extracción de ADN genómico del cogollo de palmas aceiteras, que permitió obtener mayores concentraciones de ADN de buena calidad, de acuerdo a las relaciones de absorbancias 260/280 que estuvieron dentro del rango óptimo (entre 1.8 y 2.0).
- El análisis molecular de las comunidades fúngicas y bacterianas, de plantas sanas y enfermas con PC, demostró que los estadios de la enfermedad afectaron significativamente a la diversidad de hongos y bacterias en las muestras de cogollo de palma aceitera. En este estudio, se distinguió una mayor riqueza de las comunidades fúngicas en el primer estadio, a diferencia de las comunidades bacterianas cuya riqueza fue mayor en el segundo estadio de la PC.
- En la caracterización fúngica se obtuvo una mayor abundancia del filo Ascomycota (89.30%) en plantas sanas, Ascomycota (73.17%) en el primer estadio, y Ascomycota (65.44%) junto con Basidiomycota (33.75%) en el segundo estadio. A nivel de familia, el grupo fúngico más significativo fue Saccharomycetaceae (81.87%) en plantas sanas, Nectriaceae (35.14%) en el primer estadio, y Didymellaceae (36.84%), Fomitopdidaceae (16.94%) junto a Phaeosphaeriaceae (8.25%) en el segundo estadio. El género fúngico con mayor porcentaje fue *Kazachstania* (81.81%) en plantas sanas, *Fusarium* (20.73%) y *Coprinopsis* (16.75%) en el primer estadio, y *Antrodia* (13.55%), un género no identificado de Didymellaceae (con un 26.69%) junto a *Candida* (10.82%) en el segundo estadio.
- Esta investigación constituye el primer análisis de microbiota bacteriana realizada en plantas de palma aceitera del primer y segundo estadio de la PC, de acuerdo a la literatura revisada.

- En la caracterización bacteriana los filos más abundantes fueron Proteobacterias (32.12%), Firmicutes (40.34%), Bacteroidetes (7.4%) y Acidobacterias (8.2%) en plantas sanas, Proteobacterias (43.25%), Firmicutes (37.41%), Bacteroidetes (20.93%) y Acidobacterias (3.15%) en el primer estadio, y Proteobacterias (50.31%), Firmicutes (10.72%), Bacteroidetes (29.12%) y Acidobacterias (5.25%) en el segundo estadio de la PC. El grupo familiar bacteriano más representativo fue Paenibacillaceae (31.97%) en plantas sanas, Enterobacteriaceae (19.82%) junto con Lachnospiraceae (13.68%) en el primer estadio, y Enterobacteriaceae (10.86%) junto con Bacteroidaceae (10.89%) en el segundo estadio. A nivel de género en bacterias se obtuvo una mayor frecuencia de *Paenibacillus* (31.75%) en plantas sanas, de una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (17.13%) en el primer estadio, y *Bacteroides* (10.88%) junto a la bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (7.08%) en el segundo estadio.
- El análisis metataxonómico de hongos reveló que un miembro de la familia Didymellaceae, un género *Kazachstania* y tres hongos sin clasificación taxonómica estuvieron presentes exclusivamente en plantas asintomáticas. En el análisis de bacterias se observaron dos miembros, ABS-6 y una bacteria del orden Acidimicrobiales, presentes únicamente en plantas sanas. En consecuencia, los miembros fúngicos y bacterianos mencionados anteriormente podrían considerarse como indicadores de plantas sanas y como potenciales biocontroles para protección de la palma aceitera contra la PC.
- Mediante técnicas dependientes de cultivo se obtuvo un mayor número de cepas fúngicas que de cepas bacterianas. El género *Fusarium* (17 cepas identificadas molecularmente) fue predominante en ambos estadios de la PC, cuya especie *F. solani* estuvo presente con mayor frecuencia. Para el caso de bacterias se identificaron los géneros *Citrobacter* (dos cepas), *Escherichia* (una cepa), *Stenotrophomonas* (una cepa) y *Pseudomonas* (una cepa).

- La inoculación primaria en las palmas aceiteras fue suficiente para establecer infección con las cepas E1H-35 (*F. oxysporum*), E1H15 (*F. solani*) y E1H-39 (*F. ambrosium*), y en las pruebas de patogenicidad se observó síntomas similares a la PC que incluyeron clorosis y daño necrótico en las hojas inoculadas de palma aceitera. Sin embargo, a los 50 días de evaluación no se produjeron síntomas más graves de la enfermedad como pudrición de yemas.
- Los síntomas causados por las cepas E1H-35 (*F. oxysporum*), E1H15 (*F. solani*) y E1H-39 (*F. ambrosium*), en hojas de palma aceitera, se presentaron en los tres métodos de inoculación evaluados. No obstante, el grado de severidad de síntomas externos fue mayor en el método de punción (valor $p = 0.0198$).
- Los postulados de Koch fueron respaldados por el tratamiento con la cepa E1H-35 identificada molecularmente como *F. oxysporum* y por el tratamiento con la cepa E1H-15 identificada como *F. solani*, por ende, se las ha considerado como posibles patógenos implicados en el establecimiento de la PC.
- De acuerdo a las pruebas antagónicas, la cepa E2H-3 (*Trichoderma atroviride*) y el fungicida Himexazol presentaron una mayor capacidad inhibitoria en el crecimiento de las cepas E1H-35 (*F. oxysporum*), E1H-15 (*F. solani*) y E1H-39 (*F. ambrosium*), con porcentajes de inhibición comprendidos entre 40.9% y 64.3%. En consecuencia, *Trichoderma atroviride* resulta un interesante candidato a considerarse como alternativa de control biológico de la PC.
- El contenido de fenoles totales estuvo relacionado con la capacidad antioxidante, resultando mayor en el primer estadio de la enfermedad como respuesta al ataque de los patógenos. Se evidenció que los extractos metanólicos de las hojas de palma aceitera sanas y del primer estadio de PC presentaron un mayor poder reductor de los radicales FRAP, ABTS y DPPH en comparación con las hojas del segundo estadio de PC. La caracterización de los fenoles y compuestos antioxidantes de las muestras sanas y en primer estadio servirá como base para futuros tratamientos abióticos de la enfermedad de PC.

6.1. Recomendaciones futuras

- Emplear la cepa E2H-3 (*Trichoderma atroviride*) para el control de la PC, dado que presentó mayor capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos patógenos *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *F. ambrosium*. Se recomienda aplicar este hongo antagonista tanto en plantas del primer estadio de PC como en plantas sanas, con la finalidad de reforzar el sistema de defensa de la planta y disminuir poblaciones de hongos patógenos.
- Hacer una comparativa del microbiota presente en raíces e insectos vinculados con la PC.
- Realizar un análisis metabolómico en el primer estadio de la PC, para identificar compuestos involucrados en la defensa de la palma y usarlos como un posible tratamiento contra la PC.
- Realizar un mayor número de pruebas de patogenicidad con plantas de diferentes edades, así como la evaluación de inoculaciones primarias junto con inoculaciones secundarias para estudiar la agresividad y progresión de la enfermedad.
- Caracterizar los metabolitos producidos por el hongo *Trichoderma atroviride* (cepa E2H-3) en los procesos de antagonismo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. and A. O. of the U. N. FAO, “Crops Processed,” *Palm oil production*, 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/> (accessed May 17, 2021).
- [2] G. Sarria *et al.*, “Phytophthora sp. is responsible for Bud Rot in Oil Palm in Colombia,” *Palmas*, vol. 29, pp. 31–41, 2008.
- [3] A. Sánchez, “Enfermedades de la palma de aceite en America Latina,” *Rev. Palmas*, vol. 1, no. 4, 1990.
- [4] H. De Franqueville, “Oil palm bud rot in latin america,” *Exp. Agric.*, vol. 39, pp. 225–240, 2003, doi: 10.1017/S0014479703001315.
- [5] T. Durand, “de la palma de aceite a enfermedades es parte de la estrategia de manejo integrado de plagas Genetic Improvement of Resistance of the Oil Palm to Diseases,” *Palmas*, vol. 34, no. 1, pp. 146–152, 2013.
- [6] P. D. Turner, *Oil palm diseases and disorders*, Oxford Uni. Oxford, 1981.
- [7] P. Gómez, “Estado actual de la investigación sobre pudrición de cogollo,” *Palmas*, vol. 16, no. 1, pp. 9–23, 1995.
- [8] C. Francisco and G. Andrade, “Pudrición del cogollo de la Palma de aceite en Ecuador,” in *Agronegocio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia*, Embrapa Am., A. Agostinho and J. Furlan, Eds. Belém, 2001, pp. 153–170.
- [9] J. Dzido, P. Genty, and M. Ollagnier, “Les principales maladies dupalmier à huile en Equateur,” *Oléagineux*, vol. 33, pp. 55–63, 1978, doi: <http://dx.doi.org/10.1006/pmed.1997.0148>.
- [10] Inec, “Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2019,” Quito, 2020. [Online]. Available: [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Boletin TecnicoESPAC_2019.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2019/Boletin_TecnicoESPAC_2019.pdf).
- [11] INEC, “Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (ESPAC) 2019,” Ecuador, 2019. [Online]. Available: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>.

- [12] El Universo, “Una enfermedad que mata a la palma aceitera deja desempleo en Ecuador,” 2019.
- [13] ANCUPA, “Resultados Censo Palmero 2017,” *Palma la voz del palmicultor*, Santo Domingo, pp. 1–8, 2018.
- [14] El Comercio, “Una enfermedad afecta a los cultivos de palma africana en Esmeraldas,” *Diario EL COMERCIO*, 2014. <https://www.elcomercio.com/actualidad/enfermedad-cultivos-palma-africana-esmeraldas.html>.
- [15] ANCUPA, “[Ancupa-Agrocalidad | 1,” *Guía de campo sobre la Pudrición de Cogollo*, 2013. <http://www.agrocalidad.gob.ec/documentos/dcz/4aai-guia-pc-min.pdf>.
- [16] Ministerio de Comercio Exterior, “Informe Sobre El Sector Palmicultor Ecuatoriano,” Ecuador, 2017. [Online]. Available: <http://www.comercioexterior.gob.ec/wp-content/uploads/2017/09/informe-palma-espaol.pdf>.
- [17] El Telégrafo, “El ‘cogollo’ afecta a 20 mil hectáreas de palma,” *Diario El Telégrafo*, 2014. <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/el-cogollo-afecta-a-20-mil-hectareas-de-palma>.
- [18] N. González, “Manejo de la Pudrición del Cogollo en las plantaciones ‘Guaicaramo’ y ‘Unipalma,’” Universidad Nacional de Colombia, 2010.
- [19] M. Torres, L. Rey, F. Gelves, and L. Santacruz, “Evaluación del comportamiento de los híbridos interespecíficos *Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis*, en la plantación de Guaicaramo S. A.,” *Rev. Palmas - Vol 25 No. Espec. Tomo II, 2004*, vol. 25, pp. 350–357, 2004, [Online]. Available: <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1099>.
- [20] R. Avila-Diazgranados, E. Daza, E. Navia, and H. Romero, “Response of various oil palm materials (*Elaeis guineensis* and *Elaeis oleífera* x *Elaeis guineensis* interspecific hybrids) to bud rot disease in the southwestern oil palm-growing area of Colombia,” *Agron. Colomb.*, vol. 34, no. 1, pp. 74–81, 2016, doi: 10.15446/agron.colomb.v34n1.53760.
- [21] E. Andersen, S. Ali, E. Byamukama, Y. Yen, and M. Nepal, “Disease resistance mechanisms in plants,” *Genes (Basel)*, vol. 9, pp. 2–30, 2018, doi: 10.3390/genes9070339.
- [22] R. Cristancho, C. Castilla, M. Rojas, M. Munévar, and S. Chávarro, “Relación

- entre la saturación de Al, Mg, K y la tasa de crecimiento de la pudrición de cogollo de la plama de aceite en la zona oriental,” *Palmas*, vol. 28, no. 2, pp. 24–30, 2007.
- [23] F. Chávez, *Enfermedades de la Palma Africana en Ecuador y su combate*, INIAP-Es., no. 8. Santp Domingo, Ecuador, 1986.
- [24] G. Martínez, G. Sarria, G. Torres, and F. Varón, “*Phytophthora palmivora* es el agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite Palabras clAve,” *Palmas*, vol. 31, pp. 334–344, 2010.
- [25] M. Figueroa, “Determinacion del agente causal de la ‘pudricion de la flecha’ de la Palma Africana en el Ecuador,” Universidad de Guayaquil, 1977.
- [26] G. Sarria, G. Martinez, F. Varon, A. Drenth, and D. Guest, “Histopathological studies of the process of *Phytophthora palmivora* infection in oil palm,” *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 145, pp. 39–51, 2016, doi: 10.1007/s10658-015-0810-9.
- [27] G. Sarria *et al.*, “Microorganismos asociados a la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite y su inoculación en palmas de vivero,” *Palmas*, vol. 29, pp. 19–30, 2008.
- [28] F. Rivas and L. Herrera, “Organismos asociados a la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) en San Lorenzo, Ecuador,” *Protección Veg.*, vol. 30, no. 3, pp. 193–203, 2015.
- [29] B. Perthuis, “Búsqueda de la Etiología de la Pudrición de Cogollo en el Ecuador Oriental,” *Palmas*, vol. 12, no. 2, pp. 25–30, 1991.
- [30] G. Torres, G. Sarria, F. Varón, and G. Martínez, “Evidencias Circunstanciales de la Asociación de Especies de la Familia Tettigoniidae con el Desarrollo de las Lesiones Iniciales de la Pudrición del Cogollo de la Palma de Aceite,” *Rev. Palmas*, vol. 29, pp. 53–62, 2008.
- [31] L. . Guevara and L. Nieto, “Nematodos asociados con palmas de aceite (*elaeis guineensis* Jacq.) afectadas con pudricion de cogollo,” *Palmas*, vol. 20, no. 1, pp. 93–99, 1999.
- [32] A. Drenth and B. Sendall, *Practical guide to detection and identification of Phytophthora*, vol. 1.0. Brisbane, 2001.
- [33] M. Ronquillo, C. Estévez, and G. Bernal, “*Fusarium* spp. asociados a la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Ecuador,”

- J. Agric. Univ. Puerto Rico*, vol. 97, pp. 135–148, 2013.
- [34] F. Mingorance, F. Minelli, and H. Le, “El cultivo de la Palma Africana en el Chocó,” *Suippcol*, Bogotá:, pp. 1–8, 2004.
- [35] A. Zeven, “On the origin of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.),” *Grana Palynol.*, vol. 5, pp. 121–123, 1964, doi: 10.1080/00173136409429132.
- [36] I. Maizura, N. Rajanaidu, A. Zakri, and S. Cheah, “Assessment of genetic diversity in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP),” *Genet. Resour. Crop Evol.*, vol. 53, pp. 187–195, 2006, doi: 10.1007/s10722-004-4004-0.
- [37] FAO, “Evaluación de los recursos forestales mundiales 2005: progreso hacia la ordenación forestal sostenible,” *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*, 2006. <http://www.fao.org> (accessed Jul. 26, 2020).
- [38] R. Corley and P. Tinker, “The Origin and Development of the Oil Palm Industry,” in *The Oil Palm*, L. John Wiley & Sons, Ed. 2016, pp. 1–29.
- [39] S. Bastidas, E. Rojas, and R. Cuesta, “Genealogía del germoplasma de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) del proyecto de mejoramiento genético de Corpoica,” *Palmas*, vol. 24, no. 1, 2003.
- [40] D. Richardson, “La historia del mejoramiento genético de la palma aceitera en la compañía United Fruit en América,” *ASD Oil Palm Pap.*, no. 11, pp. 1–22, 1995.
- [41] S. Rincón and D. Martínez, “Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria,” *Palmas*, vol. 30, no. 2, pp. 11–24, 2009.
- [42] M. Ronquillo, “Etiología de la pudrición del cogollo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en el Ecuador,” Universidad de Puerto Rico, 2012.
- [43] Iniap, “Manual del cultivo de la palma aceitera,” *INIAP-Estación Experimental Santo Domingo*, Santo Domingo, Ecuador, pp. 1–109, 2015.
- [44] F. Chávez and R. Julio, *Manual del cultivo de palma aceitera (Elaeis guineensis jacq.): para la zona noroccidental del Ecuador*, Pasquel. Quito, 2003.
- [45] N. Duran, R. Salas, C. Chinchilla, and F. Peralta, “Manejo de la Nutricion y Fertilizacion en Palma Aceitera en Costa Rica,” *XI Congr. Nac. Agron. Congr. Nac. Suelos*, pp. 305–316, 1999.
- [46] R. Corley and P. Tinker, “Diseases of the Oil Palm,” in *The Oil Palm*, Wiley-

- Blac., USA, 2015, pp. 399–436.
- [47] B. Perthuis, R. Desmier de Chenon, and E. Merland, “Revelation of the marchitez sorpresiva vector of the oil palm - the bug *Lincus lethifer* Dolling (Hemiptera Pentatomidae Discocephalinae),” *Oléagineux*, vol. 40, no. 10, pp. 473–476, 1985.
- [48] R. Jayawardena *et al.*, “One stop shop IV: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 76–100 (2020),” *Fungal Divers.*, vol. 103, no. 1, pp. 87–218, 2020, doi: 10.1007/s13225-020-00460-8.
- [49] G. Martínez, “Avances en la solución de la Pudrición del Cogollo de la palma de aceite en Colombia,” *Palmas*, vol. 29, no. 2, pp. 53–64, 2008.
- [50] A. Drenth, G. Torres, and G. Martínez, “*Phytophthora palmivora*, la causa de la pudrición del cogollo en la palma de aceite,” *Palmas*, vol. 34, pp. 87–94, 2013.
- [51] G. Torres, G. Sarria, G. Martinez, F. Varon, A. Drenth, and D. Guest, “Bud rot caused by *Phytophthora palmivora*: A Destructive Emerging Disease of Oil Palm,” *Phytopathology*, vol. 106, no. 4, pp. 320–329, 2015, doi: 10.1094/PHYTO-09-15-0243-RVW.
- [52] D. Mariau *et al.*, “Les maladies de type pourriture du coeur sur le palmier à huile en Amérique Latine : symptomatologie, épidémiologie, incidence,” *Oléagineux*, vol. 47, pp. 605–618, 1992.
- [53] A. Moreno, J. Camperos, R. Ávila, and H. Romero, “Biochemical and physiological responses of oil palm to bud rot caused by *Phytophthora palmivora*,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 70, pp. 246–251, 2013, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.026.
- [54] E. Bastidas, G. Enríquez, and S. Bastidas, “Observación de diferencias morfológicas en palmas de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) sin síntomas y afectadas por pudrición de cogollo,” *Revista de Ciencias Agrícolas*, pp. 25–42, 2006.
- [55] L. Nieto, P. Gómez, and C. Lozano, “Identificación y reproducción del complejo pudrición de cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.),” *Rev. Palmas*, vol. 17, no. 1, pp. 63–67, 1996, [Online]. Available: <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/546>.
- [56] L. Nieto, “Síntomas e identificación del agente causal del complejo de pudrición

- del cogollo de la palma de aceite, *Elaeis guineensis* Jacq.,” *Palmas*, vol. 17, no. 2, pp. 57–60, 1996.
- [57] G. Torres *et al.*, “Opciones de manejo de la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite en áreas de baja incidencia de la enfermedad,” *Palmas*, vol. 29, pp. 63–72, 2008.
- [58] D. Vizcaino and R. Bentancourt, “Para palma aceitera buenas prácticas,” *Agrocalidad*, Quito, p. 40, 2015.
- [59] P. Rocha, “Sanidad de la palma de aceite: diagnóstico e investigación integral liderada por el gremio palmero colombiano,” *Rev. Palmas*, vol. 28, no. 2, pp. 87–98, 2007, [Online]. Available: <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1215>.
- [60] Senasica, “Pudrición del cogollo *Phytophthora palmivora* (E.J.Butler) E.J.Butler,” Cd. de México, 2016. [Online]. Available: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215904/27_Ficha_Tecnica_-_Pudricion_del_cogollo.pdf.
- [61] H. Van De Lande and J. Zadoks, “Spatial patterns of spear rot in oil palm plantations in Surinam,” *Plant Pathol.*, vol. 48, pp. 189–201, 1999, doi: 10.1046/j.1365-3059.1999.00331.x.
- [62] D. Expert, “Withholding and exchanging iron: Interactions Between *Erwinia* spp. and Their Plant Hosts,” *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 37, no. 1, pp. 307–334, 1999, doi: 10.1080/00665983.1964.11077340.
- [63] Y. Elad and R. Baker, “Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing *Pseudomonads* on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*,” *Phytopathology*, vol. 75, no. 9, pp. 1047–1052, 1985, doi: 10.1094/phyto-75-1047.
- [64] P. Leon, L. Nieto, A. Acosta, and L. Guevara, “Pudrición de cogollo en Colombia: Importancia, investigación y posibilidades de manejo,” *Palmas*, vol. 16, pp. 198–210, 1995.
- [65] M. Remus and R. Schlechter, “Phyllosphere microbiology: at the interface between microbial individuals and the plant host,” *New Phytol.*, vol. 218, pp. 1327–1333, 2018, doi: 10.1111/nph.15054.
- [66] T. Müller and S. Ruppel, “Progress in cultivation-independent phyllosphere

- microbiology,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 87, pp. 2–17, 2014, doi: 10.1111/1574-6941.12198.
- [67] M. Vargas, “*Fusarium sotaní*: Agente causal del complejo pudrición del cogollo?,” *Palmas*, no. 1, pp. 59–67, 1992.
- [68] M. Dollet, “Etiología de la pudrición de cogollo,” *Palmas*, no. 2, pp. 33–37, 1991.
- [69] H. De Franqueville, “La pudrición del cogollo de la palma aceitera en América Latina,” *Cirad*, pp. 1–29, 2001.
- [70] M. Latijnhouwers, P. De Wit, and F. Govers, “Oomycetes and fungi: Similar weaponry to attack plants,” *Trends Microbiol.*, vol. 11, no. 10, pp. 462–469, 2003, doi: 10.1016/j.tim.2003.08.002.
- [71] T. Érsek and O. Ribeiro, “Mini Review Article: An annotated list of new *Phytophthora* species described post 1996 ,” *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica*, vol. 45, no. 2, pp. 251–266, 2010, doi: 10.1556/aphyt.45.2010.2.2.
- [72] F. Martin, Z. Abad, Y. Balci, and K. Ivors, “Identification and detection of *Phytophthora*,” *Plant Dis.*, vol. 96, no. 8, pp. 1080–1103, 2012.
- [73] R. Flood and J. Mepsted, “Marchitez Vascular de la palma africana: ¿un problema potencial para Malasia?,” *Palmas*, vol. 66, no. 776, pp. 15–19, 1990.
- [74] J. Walker, *Plant Fungal Pathogens*, 1st ed. Humana Press, 2012.
- [75] S. Akter and N. Sultana, “In-vitro management of *Erwinia carotovora* the causal organism of potato so rot disease,” *Int. J. Environ. Agric. Res. I*, vol. 4, no. 10, pp. 30–34, 2018.
- [76] A. Ahmed, “Management of soft rot disease, caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in potato tubers,” *African J. Biol. Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 211–218, 2019, doi: 10.21608/ajbs.2019.72268.
- [77] B. Fariman and S. Meon, “Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* UPM P3 from oil palm rhizosphere,” *Am. J. Appl. Sci.*, vol. 6, no. 11, pp. 1915–1919, 2009, doi: 10.3844/ajassp.2009.1915.1919.
- [78] C. Hutchison, “DNA sequencing: Bench to bedside and beyond,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 18, pp. 6227–6237, 2007, doi: 10.1093/nar/gkm688.
- [79] M. Decastro and E. Rodríguez, “Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. September, pp.

- 1–21, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01521.
- [80] MACROGEN, “Next-Gen Sequencing. Secuenciación de metagenoma,” 2018. <https://dna.macrogen.com/esp/support/ngs/intro/metagenome.jsp> (accessed Dec. 12, 2018).
- [81] E. Bolyen, J. Rideout, and M. Dillon, “Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 37, pp. 852–857, 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.
- [82] B. Callahan, P. McMurdie, M. Rosen, A. Han, A. Johnson, and S. Holmes, “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 7, pp. 581–583, 2016, doi: 10.1038/nmeth.3869.
- [83] Y. Liu *et al.*, “A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data,” *Protein Cell*, 2020, doi: 10.1007/s13238-020-00724-8.
- [84] E. Méndez *et al.*, “Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell- free system of a novel thionin, γ - hordothionin, from barley endosperm,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 194, pp. 533–539, 1990, doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15649.x.
- [85] E. Méndez, A. Rocher, M. Calero, T. Girbés, L. Citores, and F. Soriano, “Primary structure of ω -hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 239, pp. 67–73, 1996, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0067u.x.
- [86] A. War *et al.*, “Mechanisms of plant defense against insect herbivores,” *Plant Signal. Behav.*, vol. 7, no. 10, pp. 1306–1320, 2012, doi: 10.4161/psb.21663.
- [87] R. Cook *et al.*, “Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, no. May, pp. 4197–4201, 2006, doi: 10.1073/pnas.92.10.4197.
- [88] S. Campos, M. García, and B. Segundo, “The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 13, pp. 579–592, 2012, doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00773.x.
- [89] Y. Song *et al.*, “Induction of DIMBOA accumulation and systemic defense responses as a mechanism of enhanced resistance of mycorrhizal corn (*Zea mays*

- L.) to sheath blight,” *Mycorrhiza*, vol. 21, pp. 721–731, 2011, doi: 10.1007/s00572-011-0380-4.
- [90] E. Pérez *et al.*, “Determination of total phenols and flavonoids in guava leaves (*Psidium guajava* L.),” *Rev.Fac.Agron*, vol. 31, pp. 60–77, 2014, [Online]. Available: http://revfacagronluz.org.ve/PDF/enero_marzo2014/v31n1a20146077.pdf.
- [91] A. Mohamed, S. Ali, and F. El-Baz, “Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0060269.
- [92] S. Sasidharan *et al.*, “Antioxidant and hepatoprotective activity of methanolic extracts of *Elaeis guineensis* Jacq leaf,” *Pharmacologyonline*, vol. 3, pp. 84–90, 2009.
- [93] B. Barna, J. Fodor, M. Pogány, and Z. Király, “Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance,” *Pest Manag. Sci.*, vol. 59, no. January, pp. 459–464, 2003, doi: 10.1002/ps.706.
- [94] K. Thambugala, D. Daranagama, and A. Phillips, “Fungi vs . fungi in biocontrol : An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 10, pp. 1–19, 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.604923.
- [95] S. Savita, “Fungi as biological control agents,” in *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment*, vol. 55, B. Giri, R. Prasad, Q. Wu, and A. Varma, Eds. Cham: Springer, 2019, p. 456.
- [96] Y. Zhou *et al.*, “Near-complete genomes of two *Trichoderma* species: A resource for biological control of plant pathogens,” *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 33, no. 8, pp. 1036–1039, 2020, doi: 10.1094/MPMI-03-20-0076-A.
- [97] M. Pimentel *et al.*, “*Trichoderma* isolates inhibit *Fusarium virguliforme* growth, reduce root rot, and induce defense-related genes on soybean seedlings,” *APS Publ.*, vol. 104, pp. 1949–1959, 2020, doi: 10.1094/PDIS-08-19-1676-RE.
- [98] F. Freimoser, M. Paula, R. Mejia, B. Tilocca, and Q. Migheli, “Biocontrol yeasts: mechanisms and applications,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1007/s11274-019-2728-4.
- [99] M. Barber and N. Elde, “Buried Treasure: Evolutionary perspectives on

- microbial iron piracy,” *Trends Genet.*, vol. 31, no. January, pp. 627–636, 2015, doi: 10.1016/j.tig.2015.09.001.
- [100] L. Johnson, “Iron and siderophores in fungal-host interactions,” *Mycol. Res.*, vol. 112, pp. 170–183, 2008, doi: 10.1016/j.mycres.2007.11.012.
- [101] M. Armando, C. Dogi, V. Poloni, C. Rosa, A. Dalcerro, and L. Cavaglieri, “In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 161, no. 3, pp. 182–188, 2013, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.016.
- [102] L. Cubaiu, H. Abbas, A. Dobson, M. Budroni, and Q. Migheli, “A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin a biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*,” *Toxins (Basel)*, vol. 4, pp. 1468–1481, 2012, doi: 10.3390/toxins4121468.
- [103] M. Armando, C. Dogi, C. Rosa, A. Dalcerro, and L. Cavaglieri, “*Saccharomyces cerevisiae* strains and the reduction of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production at different interacting environmental conditions, in vitro,” *Food Addit. Contam. Part A*, vol. 29, no. 9, pp. 1443–1449, 2012, doi: 10.1080/19440049.2012.698655.
- [104] D. Fira, I. Dimkić, T. Berić, J. Lozo, and S. Stanković, “Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species,” *J. Biotechnol.*, vol. 285, no. 8, pp. 44–55, 2018, doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.
- [105] Y. Cao *et al.*, “Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber,” *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 135, pp. 32–39, 2012, doi: 10.1016/j.scienta.2011.12.002.
- [106] R. Hanene, H. Abdeljabbar, R. Marc, and B. Abdellatif, “Biological control of *Fusarium* foot rot of wheat using fengycin-producing *Bacillus subtilis* isolated from salty soil,” *African J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 34, pp. 8464–8475, 2012, doi: 10.5897/AJB11.2887.
- [107] G. Ayoola *et al.*, “Phytochemical screening and antioxidant activities of some Indian medicinal plants used for malaria therapy,” *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 7, no. 3, pp. 1019–1024, 2008, doi: 10.4314/tjpr.v7i3.14686.
- [108] Applied Biological Materials Inc., “Plant Ex-Amp Extraction Buffer Set Cat. No.

- G934.” www.abmGood.com (accessed Jun. 03, 2019).
- [109] OPSDiagnostics, “CTAB Protocol for Isolating DNA from Plant Tissues.” https://opsdiagnostics.com/notes/protocols/ctab_protocol_for_plants.htm (accessed Mar. 25, 2020).
- [110] J. Doyle, “DNA Protocols for Plants,” *Mol. Tech. Taxon.*, pp. 283–293, 2011, doi: 10.1007/978-3-642-83962-7_18.
- [111] O. De Assis Costa, D. Tupinambá, J. Bergmann, C. Barreto, and B. Quirino, “Fungal diversity in oil palm leaves showing symptoms of Fatal Yellowing disease,” *PLoS One*, vol. 13, pp. 1–17, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0191884.
- [112] K. Wilson, “Preparation of Genomic DNA from Bacteria,” in *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley., 2001, p. 7.
- [113] K. Weising, H. Nybom, K. Wolff, and G. Kahl, *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. USA: CRC Press, 2005.
- [114] D. Lane, “16S/23S rRNA sequencing,” *Nucleic acid Tech. Bact. Syst.*, pp. 115–175, 1991.
- [115] A. Crawford, B. Bassam, A. Drenth, D. Maclean, and J. Irwin, “Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis (Mycological Research (1996) 100 (437-443)),” *Mycol. Res.*, vol. 100, no. 10, p. 1218, 1996, doi: 10.1016/S0953-7562(96)80183-3.
- [116] L. Tedersoo, R. Drenkhan, S. Anslan, C. Morales, and M. Cleary, “High-throughput identification and diagnostics of pathogens and pests: Overview and practical recommendations,” *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 19, no. August 2018, pp. 47–76, 2019, doi: 10.1111/1755-0998.12959.
- [117] M. Maizatul, M. Dickinson, and A. Idris, “Molecular characterization of *Phytophthora palmivora* responsible for bud rot disease of oil palm in Colombia,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 0, p. 0, 2019, doi: 10.1007/s11274-019-2618-9.
- [118] F. Martin and P. Tooley, “Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death,” *Mycol. Res.*, vol. 107, no. December, pp. 1379–1391, 2003, doi: 10.1017/S0953756203008785.
- [119] M. Estaki *et al.*, “QIIME 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse

- microbiome data and comparative studies with publicly available data,” *Curr. Protoc. Bioinforma.*, vol. 70, pp. 1–46, 2020, doi: 10.1002/cpbi.100.
- [120] K. Abarenkov *et al.*, “The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives,” *New Phytol.*, no. 186, pp. 264–266, 2010, doi: 10.1111/nph.12154.
- [121] N. Bokulich, M. Ziemski, M. Robeson, and B. Kaehler, “Measuring the microbiome: Best practices for developing and benchmarking microbiomics methods,” *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 18, pp. 4048–4062, 2020, doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.049.
- [122] S. Anslan, R. Nilsson, C. Wurzbacher, P. Baldrian, L. Tedersoo, and M. Bahram, “Great differences in performance and outcome of high-throughput sequencing data analysis platforms for fungal metabarcoding,” *MycKeys*, vol. 39, pp. 29–40, 2018, doi: 10.3897/mycokeys.39.28109.
- [123] M. Hall and R. Beiko, “16S rRNA Gene Analysis with QIIME2,” in *Microbiome Analysis*, vol. 1849, R. Beiko, W. Hsiao, and J. Parkinson, Eds. New York: Humana Press, 2018, pp. 113–129.
- [124] R. Carbonó and D. Olaya, “Bacterias fitopatógenas asociadas a la enfermedad de pudrición de cogollo en el cultivo de la Palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en el municipio de zona bananera (Magdalena).,” Universidad del Magdalena, 2017.
- [125] J. Leslie and B. Summerell, *Fusarium laboratory manual*, Wiley-Blac. Estados Unidos, 2006.
- [126] S. Jeffers, “Identifying species of *Phytophthora*,” *Phytopathology*, vol. 77, no. August, pp. 1475–1482, 1987.
- [127] S. Jeffers, “Identifying species of *Phytophthora* based on morphology,” *Am. Phytopathol. Soc.*, vol. 1, no. November, pp. 8–10, 2015, doi: <http://dx.doi.org/10.1094/9780890544969.01.01.1.pdf>.
- [128] W. Harrigan and M. McCance, “Appendix 1 - Schemes for the identification of microorganisms,” in *Laboratory Methods in Microbiology*, Academic Press, 1966, pp. 197–253.
- [129] H. Viswanath, K. Bhat, N. Bhat, T. Wani, and M. Mughal, “Antibacterial efficacy of aqueous plant extracts against storage soft rot of potato caused by

- Erwinia carotovora*,” *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 7, no. January, pp. 2630–2639, 2018, doi: 10.20546/ijcmas.2018.701.314.
- [130] H. Barnett and B. Hunter, *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota, USA: Burgess Publishing Company, 1998.
- [131] J. Gilman, *A manual of soil fungi*, The Iowa S. Iowa, USA: The Iowa State University Press, 1957.
- [132] R. Hanlin, *Illustrated genera of ascomycetes*, APS Press. Minnesota, USA: APS Press, 2001.
- [133] M. Urbietta, E. González, Á. Bazán, M. Giaveno, and E. Donati, “Comparison of the microbial communities of hot springs waters and the microbial biofilms in the acidic geothermal area of Copahue (Neuquén, Argentina),” *Extremophiles*, vol. 19, pp. 437–450, 2015, doi: 10.1007/s00792-015-0729-2.
- [134] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549, 2018, doi: doi:10.1093/molbev/msy096.
- [135] E. Brito *et al.*, “Microbial diversity in Los Azufres geothermal field (Michoacán, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers,” *Extremophiles*, vol. 18, pp. 385–398, 2014, doi: 10.1007/s00792-013-0624-7.
- [136] G. Castellanos, C. Jara, and G. Mosquera, *Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol*. Cali, Colombia: CIAT, 2011.
- [137] G. Martínez and G. Sarria, “Estado del arte de la investigación y control de la pudrición del cogollo (PC),” *Palmas*, vol. 34, no. 2, pp. 47–57, 2013.
- [138] G. Martínez and G. Torres, “Presencia de la pudrición de cogollo de la palma de aceite (PC) en plantas de vivero,” *Palmas*, vol. 28, no. 4, pp. 13–20, 2007.
- [139] S. Alaniz, M. León, A. Vicent, J. García, P. Abad, and J. Armengol, “Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain,” *Am. Phytopathol. Soc.*, vol. 91, no. 9, pp. 1187–1193, 2007, doi: doi:10.1094/ PDIS-91-9-1187.
- [140] J. Kranz, “Measuring plant disease,” in *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology*, J. Kranz and J. Rotem, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer, 1988, pp. 35–50.
- [141] S. Garrett, “Disease measurement in plant pathology,” in *Transactions of the*

- British Mycological Society*, no. 3–4, 1948, pp. 343–345.
- [142] D. González, G. Gómez, A. Fernández, D. Villant, and A. Falcón, “Actividad inhibitoria de un polímero de quitosana en el crecimiento vegetativo y la reproducción asexual de un aislado de *Phytophthora palmivora* Butler,” *Rev. Protección Veg.*, vol. 31, no. 2, pp. 99–106, 2016, [Online]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000200004.
- [143] J. Ibarra *et al.*, “Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos,” *Rev. Latinoam. Microbiol.*, vol. 48, pp. 113–120, 2006.
- [144] J. Whipps, “Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere,” *J. Exp. Bot.*, vol. 52, no. March, pp. 487–511, 2001, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11326055>.
- [145] D. Haas and G. Défago, “Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. March, pp. 307–319, 2005, doi: 10.1038/nrmicro1129.
- [146] J. Martínez, L. Nieto, and M. Hernández, “Efecto de algunos fungicidas en el control del complejo pudrición de cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.),” *Rev. Palmas*, vol. 18, no. 4, p. 9, 1997.
- [147] C. Ning, N. Ding, G. Wu, H. Meng, Y. Wang, and Q. Wang, “Proteomics research on the effects of applying selenium to apple leaves on photosynthesis,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 70, no. 95, pp. 1–6, 2013, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.008.
- [148] D. Rivero, A. Cruz, B. Martínez, M. Ramírez, A. Rodríguez, and R. Cárdenas, “Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium* sp,” *Rev. Protección Veg.*, vol. 19, no. January, pp. 140–144, 2004, [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/275024121>.
- [149] Lady Palomino, C. García, J. Gil, B. Rojano, and D. Durango, “Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia),” *Rev. la Fac. Química Farm.*, vol. 16, no. September, pp. 388–395, 2009.
- [150] T. Sepúlveda, G. Gómez, and J. Zapata, “Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote),” *Rev. Cuba.*

- Plantas Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 133–144, 2016, [Online]. Available: <http://scielo.sld.cu>.
- [151] Z. Foster, T. Sharpton, and N. Grünwald, “Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005404.
- [152] M. Adeolu, S. Alnajar, S. Naushad, and R. Gupta, “Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 66, no. 12, pp. 5575–5599, 2016, doi: 10.1099/ijsem.0.001485.
- [153] G. Torres, G. Sarria, F. Varon, M. Coffey, M. Elliott, and G. Martinez, “Bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on african oil palm in Colombia,” *Plant Dis.*, vol. 94, pp. 1163–1163, 2010, doi: 10.1094 / PDIS-94-9-1163A.
- [154] G. Sarria, “Nuevas evidencias del cumplimiento de los postulados de Koch en el estudio de las relaciones entre *Phytophthora palmivora* y la pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite,” *Palmas*, vol. 34, no. 4, pp. 73–83, 2013.
- [155] T. Riit, L. Tedersoo, and R. Drenkhan, “Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding,” *MycKeys*, vol. 14, pp. 17–30, 2016, doi: 10.3897/mycokeys.14.9244.
- [156] T. Riit, L. Tedersoo, R. Drenkhan, E. Runno, H. Kokko, and S. Anslan, “Corrigendum for: ‘Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding’ published in MycoKeys, doi: 10.3897/mycokeys.14.9244,” *MycKeys*, vol. 41, pp. 119–120, 2018, doi: 10.3897/mycokeys.41.30558.
- [157] M. Lin, P. Boss, M. Walker, K. Sumby, and V. Jiranek, “Influence of *Kazachstania* spp. on the chemical and sensory profile of red wines,” *Int. J. Food Microbiol.*, no. August, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109496.
- [158] M. Li *et al.*, “Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*,” *Nature*, vol. 464, no. 7287, pp. 367–373, 2011, doi: 10.1038/nature08850.
- [159] M. Agler *et al.*, “Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation,” *Plos Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–31, 2016, doi:

- 10.1371/journal.pbio.1002352.
- [160] M. Gholami, J. Amini, J. Abdollahzadeh, and M. Ashengroph, “Basidiomycetes fungi as biocontrol agents against take-all disease of wheat,” *Biol. Control*, vol. 130, pp. 34–43, 2019, doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.12.012.
- [161] L. Lombard, N. Van der Merwe, J. Groenewald, and P. Crous, “Generic concepts in Nectriaceae,” *Stud. Mycol.*, vol. 80, pp. 189–245, 2015, doi: 10.1016/j.simyco.2014.12.002.
- [162] T. Kuo, C. Yang, H. Chang, and Y. Hsueh, “Nematode-trapping fungi produce diverse metabolites during predator – Prey interaction,” *Metabolites*, vol. 10, no. 117, pp. 2–24, 2020, doi: doi:10.3390/metabo10030117.
- [163] A. Deveau *et al.*, “Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 42, no. 3, pp. 335–352, 2018, doi: 10.1093/femsre/fuy008.
- [164] P. Hardoim *et al.*, “The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 79, pp. 293–320, 2015, doi: 10.1128/membr.00050-14.
- [165] M. Schlegel, V. Dubach, L. von Buol, and T. Sieber, “Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 92, no. 9, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1093/femsec/fiw142.
- [166] C. Ash, F. Priest, and M. Collins, “Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 64, no. 3–4, pp. 253–260, 1993, doi: 10.1007/BF00873085.
- [167] X. Liu, Q. Li, Y. Li, G. Guan, and S. Chen, “*Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth,” *PeerJ*, vol. 7, pp. 1–19, 2019, doi: 10.7717/peerj.7445.
- [168] X. Wang *et al.*, “Isolation and characterization of antagonistic bacteria *Paenibacillus jamilae* HS-26 and their effects on plant growth,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, pp. 1–13, 2019, doi: 10.1155/2019/3638926.
- [169] L. Seldin, “*Paenibacillus*, nitrogen fixation and soil fertility,” in *Endospore-forming Soil Bacteria*, vol. 27, N. Logan and P. De Vos, Eds. 2011, pp. 287–307.
- [170] H. Jeong, S. Choi, C. Ryu, and S. Park, “Chronicle of a soil bacterium:

- Paenibacillus polymyxa* E681 as a tiny guardian of plant and human health,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00467.
- [171] G. Sundin, L. Castiblanco, X. Yuan, Q. Zeng, and C. Yang, “Bacterial disease management: Challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in bacterial molecular plant pathology,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 17, no. 9, pp. 1506–1518, 2016, doi: 10.1111/mpp.12436.
- [172] F. Wemheuer, B. Wemheuer, R. Daniel, and S. Vidal, “Deciphering bacterial and fungal endophyte communities in leaves of two maple trees with green islands,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50540-2.
- [173] M. Tondo, M. Delprato, I. Kraiselburd, M. Zenoff, M. Farías, and E. Orellano, “KatG, the bifunctional catalase of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, responds to hydrogen peroxide and contributes to epiphytic survival on citrus leaves,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, pp. 1–19, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151657.
- [174] A. Buitrago and L. Nieto, “Hongos asociados con pudriciones de flecha y cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en los Llanos Orientales,” *Rev. Palmas*, vol. 16, no. 4, p. 9, 1995.
- [175] H. Ho, “The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*,” *J. Bacteriol. Mycol.*, vol. 6, no. 1, pp. 40–45, 2018, doi: 10.15406/jbmoa.2018.06.00174.
- [176] G. Rastogi, J. Tech, G. Coaker, and J. Leveau, “A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 83, no. 2, pp. 127–132, 2010, doi: 10.1016/j.mimet.2010.08.006.
- [177] I. Mohamed, S. Sundeam, and V. Ramachandran, “Pathogenicity of Malaysian *Phytophthora palmivora* on cocoa, durian, rubber and oil palm determines the threat of bud rot disease,” *For. Pathol.*, vol. 49, no. 6, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1111/efp.12557.
- [178] B. Perthuis, “Association of the soil insect *Scaptocoris minor* Berg (Heteroptera, Cydnidae) with foci of bud-rot diseases of oil palm in eastern Ecuador,” *Int. J. Trop. Insect Sci.*, vol. 41, no. 2, pp. 1883–1887, 2021, doi: 10.1007/s42690-020-00356-9.
- [179] L. C. Martínez, J. Aldana, H. Calvache, and A. Vilianueva, “Biología de *Leucothyreus* sp. (Coleoptera:Scarabaeidae), defoliador de palma de aceite

- (*Elaeis guineensis* Jacq .), en San Vicente de Chucurí (Santander),” *Rev. Palmas*, vol. 21, no. 1, pp. 212-220, 2000, [Online]. Available: <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/787>.
- [180] R. Hurtado and V. Rincón, “La geomática como instrumento para modelar y hacer seguimiento a la pudrición del cogollo (PC) y al insecto plaga: *Rhynchophorus palmarum*. Zona Occidental - Tumaco (Colombia),” *Palmas*, vol. 30, no. 3, pp. 21–35, 2009.
- [181] R. Aldana, O. Moya, J. Aldana, and H. Gomes, *Guía de bolsillo para el manejo de Rhynchophorus palmarum*, no. 1. 2012.
- [182] S. Munné and L. Alegre, “Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts,” *Planta*, vol. 214, no. 4, pp. 608–615, 2002, doi: 10.1007/s004250100646.
- [183] A. Velásquez, C. Castroverde, and S. Yang, “Plant and pathogen warfare under changing climate conditions,” *Curr. Biol.*, vol. 28, no. 10, pp. R619–R634, 2019, doi: 10.1016/j.cub.2018.03.054.Plant.
- [184] G. Kumar, A. Maharshi, J. Patel, H. Singh, and B. Sarma, “*Trichoderma*: A potential fungal antagonist to control plant diseases,” *SATSA Mukhapatra - Annu. Tech. Issue*, vol. 21, pp. 206–2018, 2017.
- [185] O. Hewedy, K. Abdel, and R. Bakr, “Genetic diversity and biocontrol efficacy of indigenous *Trichoderma* isolates against *Fusarium* wilt of pepper,” *J. Basic Microbiol.*, vol. 60, pp. 126–135, 2020, doi: 10.1002/jobm.201900493.
- [186] K. Brunner *et al.*, “Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 7, pp. 3959–3965, 2005, doi: 10.1128/AEM.71.7.3959.
- [187] I. Zalilai *et al.*, “Antagonist effects of *Bacillus* spp . strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*),” *Microbiol. Res.*, vol. 192, pp. 148–158, 2016, doi: 10.1016/j.micres.2016.06.012.
- [188] M. Rojas, D. Sánchez, K. Rosales, and D. Lugo, “Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas,” *Rev. Protección Veg*, vol. 32, no. 2, pp. 1–9, 2017.
- [189] J. Nosanchuk, R. Stark, and A. Casadevall, “Fungal melanin: What do we know

- about structure?,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, pp. 1–7, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.01463.
- [190] H. Eisenman and A. Casadevall, “Synthesis and assembly of fungal melanin,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 93, no. 3, pp. 931–940, 2012, doi: 10.1007/s00253-011-3777-2.Synthesis.
- [191] J. Chen *et al.*, “Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* in rhizosphere of *Radix pseudostellariae* triggers the expression of host defense genes and improves its growth under long-term monoculture system,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, no. March, pp. 1–12, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.579920.
- [192] A. Peix, P. Mateos, C. Rodriguez, E. Martinez, and E. Velazquez, “Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 33, no. 14, pp. 1927–1935, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00119-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00119-5).
- [193] Y. Zhao, R. Thilmony, C. L. Bender, A. Schaller, S. Y. He, and G. A. Howe, “Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway,” *Plant J.*, vol. 36, p. 485±499, 2003, doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01895.x.
- [194] R. Tsao, “Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols,” *Nutrients*, vol. 2, pp. 1231–1246, 2010, doi: 10.3390/nu2121231.
- [195] E. Kuskoski, A. Asuero, A. Troncoso, J. Mancini, and R. Fett, “Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos,” *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, vol. 25, no. 4, pp. 726–732, 2005, doi: 10.1590/S0101-20612005000400016.
- [196] O. Hassan, T. Chang, and A. Hossain, “Changes in the secondary compounds of persimmon leaves as a defense against circular leaf spot caused by *Plurivorosphaerella nawae*,” *PLoS One*, vol. 15, no. 3, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0230286.
- [197] O. Ajayi, S. Awala, A. Ogunleye, and F. Okogbue, “Antimicrobial screening and phytochemical analysis of *Elaeis guineensis* (Ewe Igi Ope) against *Salmonella* strains,” *Br. J. Pharm. Res.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–9, 2016, doi: 10.9734/BJPR/2016/23659.

- [198] U. Takahama and T. Oniki, "Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate," *Plant Cell Physiol.*, vol. 33, no. 4, pp. 379–387, 1992, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078265.
- [199] J. Dumanović, E. Nepovimova, M. Natić, K. Kuča, and V. Jačević, "The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview," *Front. Plant Sci.*, vol. 11, no. January, 2021, doi: 10.3389/fpls.2020.552969.
- [200] A. Payne, A. Mazzer, G. Clarkson, and G. Taylor, "Antioxidant assays - consistent findings from FRAP and ORAC reveal a negative impact of organic cultivation on antioxidant potential in spinach but not watercress or rocket leaves," *Food Sci. Nutr.*, vol. 1, no. 6, pp. 439–444, 2013, doi: 10.1002/fsn3.71.
- [201] B. Halvorsen *et al.*, "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants," *J. Nutr.*, vol. 132, no. 3, pp. 461–471, 2002, doi: 10.1093/jn/132.3.461.