

INFORME ANUAL 2024

ESTACIÓN EXPERIMENTAL LITORAL SUR

DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN VEGETAL

LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA

Lenin Paz Carrasco

ÍNDICE

MATRIZ DE ACTIVIDADES:	5
1. ACTIVIDAD 1. Elaboración del protocolo de investigación relacionado con el modelo matemático-manchado del grano.	6
1.1 JUSTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
2. ACTIVIDAD 2. Identificación por morfología estructuras reproductivas de un hongo asociado a la patología de la muerte descente (muerte regresiva) en cacao.	21
2.1 ANTECEDENTES.....	21
2.2 OBJETIVO	22
2.3 METODOLOGÍA	22
2.4 RESULTADOS.....	22
2.5 CONCLUSIONES.....	23
2.6 RECOMENDACIONES.....	23
2.7 REFERENCIAS	23
3. Actividad 3. Reacción de cinco materiales de arroz a la enfermedad de la mancha agregada de la vaina en arroz.	24
3.1 ANTECEDENTES.....	24
3.2 OBJETIVO	25
3.3 METODOLOGÍA	25
3.4 Resultados	26
3.4.1 <i>Reacción genética de los materiales de arroz</i>	26
3.5 CONCLUSIONES.....	26
3.6 RECOMENDACIONES.....	26
3.7 REFERENCIAS	26
4. Actividad 4. Evaluación de materiales de arroz a la enfermedad del entorchamiento.	27
4.1 ANTECEDENTES.....	27
4.2 METODOLOGÍA	27
4.3 RESULTADOS.....	28
4.4 CONCLUSIONES.....	28
4.5 RECOMENDACIONES.....	28

4.6	REFERENCIA	28
5.	Actividad 5. Caracterización molecular, y microbiológica de aislados bacterianos asociados a la Pudrición del Cogollo (PC)._____	29
5.1	ANTECEDENTES.....	29
5.2	METODOLOGÍA	30
5.2.1	<i>Recolección de muestras.....</i>	30
5.2.2	<i>Aislamiento de bacterias.....</i>	30
5.2.3	<i>Identificación de posibles bacterias patogénicas mediante el esquema de Schaad</i>	30
5.2.4	<i>Extracción de ADN y amplificación or PCR de los aislados bacterianos</i>	31
5.2.5	<i>Pruebas bioquímicas para la caracterización de factores virulentos</i>	31
5.3	RESULTADOS.....	32
5.4	CONCLUSIONES.....	34
a.	RECOMENDACIONES.....	34
5.6	REFERENCIAS	35

INFORME ANUAL 2024

1. **Departamento/Programa:** Protección Vegetal / Fitopatología
2. **Director de la Estación Experimental:** Mestanza Velasco Saúl
3. **Coordinador Nacional I+D+i :** Carlos Estuardo Caicedo Vargas
4. **Responsable del Departamento en la Estación Experimental:** Paz Carrasco Lenin
5. **Proyectos:**

Proyecto 1

Título del proyecto:	Desarrollo e implementación de tecnologías productivas en el cultivo de arroz, para aumentar la resiliencia de pequeños y medianos productores al cambio climático en Ecuador
Código del proyecto:	FIASA-EELS-2022-009
Presupuesto total:	913.394,49
Recurso estimado que INIAP ofrece en contraparte:	401.656,53
Recurso estimado que recibe el INIAP:	511.737,96
Institución financiadora:	FIASA
Responsable o director del proyecto en el INIAP:	Celi Herán Roberto Evaristo
Número de memorando:	NIAP-EELS_DIR-2021-0902-MEM
Duración:	36 meses
Fecha de inicio:	Abril del 2022
Fecha de finalización:	Marzo de 2025

6. Socios externos estratégicos para la ejecución de la I&D+i durante el 2024:

Nombre de la institución	Siglas de la institución	Nombre de contacto o punto focal
Plant Health Institute Montpellier / Institut de Reserche pour le Développement	PHIM / IRD / Francia	Eugenie Hébrard Nils Poulicad Adeline Pinault

7. Publicaciones del 2024:

Publicaciones Técnicas:

Paz, L; Pinault, A; Poulicard, N; Hébrard, E; Jaffré, E-L; Celi, R; Valle, A; Panchana, C. 2024. Potencial impacto de la enfermedad viral del “entorchamiento” en cereales en Ecuador. Yaguachi, EC, Estación Experimental Litoral Sur. 10 p. (Boletín Técnico No. 192)

8. Participación en eventos de difusión científica y técnica :

Participación 1

Título del trabajo:	Movilidad científica al Instituto francés de Investigación para el Desarrollo
Nombres del autor:	Paz Carrasco Lenin
Tipo de participación:	Expositor
Nombre del evento científico:	Análisis de Investigación en el Tiempo de la Enfermedad del “Entorchamiento” del Arroz en Ecuador
Institución o instituciones organizadoras:	INIAP
Fechas del evento:	25 de septiembre de 2024
Ciudad sede del evento:	Parroquia Virgen de Fátima / Yaguachi / Guayas

9. Hitos/Actividades establecidas en el POA:

9.1 Establecimiento de un procedimiento matemático para inferir aceptación o rechazo de lotes de arroz con presencia de manchado de grano.

9.2 Estudio sobre la muerte descendente (regresiva) en cacao.

9.3 Evaluación de materiales de arroz a la mancha agregada de la vaina.

9.4 Evaluación de materiales de arroz al entorchamiento

9.5 Caracterización microbiológica, molecular y bioquímica de aislados bacterianos de la Pudrición del Cogollo (PC)

MATRIZ DE ACTIVIDADES:

Actividades planificadas en los hitos	
Actividades	Indicador de Resultado
1. Protocolo de investigación relacionado con el modelo matemático-manchado del grano.	Aprobación del Comité Técnico
2. Identificación por morfología estructuras reproductivas de un hongo asociado a la patología de la muerte descende (muerte regresiva) en cacao.	Observación de conidio y picnidio asociado a <i>Botryosphaeriaceae</i>

3. Reacción de cinco materiales de arroz a la enfermedad de la mancha agregada de la vaina en arroz.	Porcentaje de daño en los tallos en materiales de arroz
4. Evaluación de materiales de arroz al entorchamiento	Incidencia de la enfermedad en materiales de arroz
5. Caracterización microbiológica, molecular y bioquímica de aislados bacterianos de la Pudrición del Cogollo (PC).	Número de aislados bacterianos identificados

1. ACTIVIDAD 1. Elaboración del protocolo de investigación relacionado con el modelo matemático-manchado del grano.

Responsable:	Paz Carrasco Lenin Celi Herán Roberto Valle Choez Anthony
Colaboradores:	Del Alcázar Hernán Mosquera Edinson Carranza Maribel Arboleda Javier Panchana Torres Carolina
Nombre del proyecto que financiará el estudio:	Fondos Fiscales
Institución donante:	INIAP
Número de memorando: En proceso de revisión del Comité Técnico	Acta de Comité Técnico No. 050-2024 /28-11-2024

1. ANTECEDENTES

El manchado de grano en arroz (*Oryza sativa* L.) es una enfermedad que provoca deterioro significativo en todos los parámetros relacionados con la calidad de semilla.

En nuestro medio, la enfermedad de manchado de grano se la tiene definida por causas relacionadas a organismos de naturaleza fungosa y bacteriana (Paz 2023).

Este daño en la semilla de arroz ha permitido que los técnicos calificadores del Ministerio de Agricultura (MAG) y del mismo Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) no dispongan de parámetros de una estadística de probabilidad para la toma de decisiones para aceptar o rechazar lote(s) de multiplicación de semilla de arroz.

El manchado de grano según lo manifestado por Huang et al. (2011) lo causan las especies de hongos *Fusarium proliferatum*, *Bipolaris australiensis*, *Curvularia lunata* y *Alternaria tenuis* originando daños de pudrición en la espiga. Estas especies de hongos requieren para su desarrollo y esporulación condiciones favorables de temperatura, pH, fuente de carbono y nitrógeno como componentes necesarios que inciden en el metabolismo de estos organismos.

Otro investigador (Hallowin, 1986) establece que los hongos *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Cladosporium* son contaminantes que invaden más a las semillas durante o después de su maduración fisiológica; y, durante las operaciones de cosecha. Este mismo investigador indicó, que algunas especies de *Fusarium* son parásitos facultativos de semillas y que llegan estos a desarrollarse como parásito dentro del sistema vascular de la planta pudiendo por esta vía infectar a la semilla.

Ou (1985) había mencionado que *Cochliobolus miyabeanus*, *Sarocladium oryzae*, *Pyricularia oryzae* y *Gaeumannomyces graminis* son hongos que pueden ser transmitidos por semilla; y, que las especies de hongos *S. oryzae*, *Sclerotium oryzae*, *C. miyabeanus*, *P. oryzae*, *G. graminis* y *Ustilaginoidea virens* tienen la facultad de poder sobrevivir como propágulos en el suelo y, en los residuos de cosecha de la planta de arroz.

En otra investigación que llevaron Lee et al. (1986) se refieren a que el manchado del grano se lo atribuye a un daño ocasionado por el insecto *Leptocoris oratorius* y, por los hongos, *Drechslera oryzae*, *Curvularia lunata*, *Trichoconiella padwickii*, *S. oryzae*, *A. tenuis* y *F. solani*.

Otro grupo de organismos que también se lo asocian con el manchado del grano, son las bacterias de los géneros *Coryneforme* spp., *Pantoea* spp. y *Pseudomonas* spp. siendo las que más prevalecen en la semilla de arroz y, que la especies de *Actinomyces* spp., *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Burkholderia glumae*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus polymyxa*, *Staphylococcus* spp. y *Xanthomonas* spp. son detectadas regularmente (Cottyn et al., 2009). Además, Cortesi et al. (2008) hacen referencia que *P. stutzeri*, *P. fulva* y *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* incrementan la incidencia de la decoloración de los granos en arroz.

De acuerdo a lo expresado, existe una naturaleza compleja de organismos que se presentan en las glumas de las espiguillas del arroz en dependencia a determinados factores abióticos que se presenta durante el desarrollo del cultivo.

Debido a la difícil condición de tener lotes totalmente sanos para los diversos ambientes donde se multiplica la semilla de arroz; se requiere disponer de herramientas estadísticas estandarizadas que permita inferir la aceptación o rechazo de los lotes afectados con incidencia y daño variable con manchado del grano; apoyado adicionalmente de microbiología y epidemiología.

Un caso de estudio es lo relacionado con el tizón del halo del fréjol causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* que fue investigado durante seis años con semilla comercial; y se llegó a demostrar que, de 10.000 semillas de fréjol cinco estuvieron infectadas con este organismo dando como resultado una

epidemia de esta enfermedad. Una situación opuesta fue, que a partir de 20.000 semillas una de ellas que resultó estar infectada no llegó a generar una situación de epidemia (Schaad, 1982).

La enfermedad de la pudrición negra de las crucíferas causada por el patógeno de semilla *Xanthomonas campestris* puede constituirse en fuente de inóculo cuando esta bacteria contamina semillas de col y que la detección de esta bacteria utilizando principios microbiológicos de laboratorio puede ayudar a reducir la incidencia de esta enfermedad (Schaad et al., 1980).

Burkholderia glumae es una bacteria que se caracteriza por causar pudrición de los granos de arroz incidiendo en la pérdida de rendimiento; además, esta bacteria causa pudrición de plántulas en el semillero lo que facilita su detección temprana en los almacigos antes de su trasplante. El control de esta bacteria es difícil solo por medio de una gestión de manejo como el empleo de semillas certificadas libres de *B. glumae*, prácticas culturales adecuadas y cultivares resistentes son aquellas estrategias que permiten llegar a mitigar el impacto negativo de esta enfermedad en el cultivo de arroz (Kyu et al., 2012).

Geng et al. (1983) habían propuesto que, para un control de calidad de semillas, es necesario establecer el tamaño óptimo de la muestra para que sea permisible la detección del nivel bajo de contaminación de semilla enferma y poder así, garantizar el éxito de la probabilidad estadística empleada.

2. JUSTIFICACIÓN

Existe la carencia de una metodología de probabilidad estadística para la aceptación de lotes de multiplicación de semilla de arroz en ambientes impredecibles para la afectación con el manchado de grano.

Así mismo, existe un desconocimiento del rol de los carbohidratos en la semilla de arroz, el clima, el suelo y los químicos (herbicidas e insecticidas quelantes) y su interacción biótica con hongos, bacterias y nemátodos (principalmente *Aphelenchoides besseyi*) que permitan esclarecer el desarrollo de la patología del manchado de grano.

La investigación con los objetivos específicos que se propone es justificada por no disponer de datos e información relacionada con el control de calidad de semilla de arroz y de los factores que conllevan a la manifestación de la enfermedad del manchado del grano.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Generar una metodología de control de calidad de semilla en arroz con procedimientos de biometría y microbiología para la selección de lotes de multiplicación de semilla con el límite bajo de nivel de contaminación con manchado de grano.

3.2 Objetivos Específicos.

1. Determinar el tamaño de muestra óptima que permita la detección del límite bajo de nivel de semilla contaminada en un lote de multiplicación de semilla de arroz.
2. Realizar un análisis de correlación con el tipo de carbohidrato determinado, porcentaje de germinación con la incidencia de especies de hongos y bacterias asociadas con la patología de manchado de semilla en arroz.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis teórica

¿Es posible con la biometría satisfacer las demandas para el control de calidad de lotes de multiplicación de semilla de arroz con incidencia y severidad de manchado de grano dentro de los límites permisibles por la Unidad de Beneficio?

4.2 Hipótesis estadística

Decisión	Hipótesis nula	
	Verdadera	Falsa
Rechazar H_0	Error tipo I α	Correcto $1 - \alpha$
Aceptar H_0	Correcto $1 - \alpha$	Error tipo II β

Error de tipo I llega a comprometerse si se rechaza la hipótesis nula cuando es verdadera. La probabilidad de un error tipo I se lo demuestra como α .

Error de tipo II llega a comprometerse si se acepta la hipótesis nula cuando es falsa y cuando la hipótesis de la investigación es verdadera. La probabilidad de un error tipo II se lo demuestra como β .

5. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Determinación del tamaño de muestra óptima que permita la detección del límite bajo de nivel de semilla contaminada en un lote de multiplicación de semilla de arroz.

1.1. Términos biométricos y fitopatológico utilizados

Técnica de muestreo: Diseño de muestreo específico, tamaño de muestra e intensidad de muestreo.

Tamaño de muestra: Número de plantas o unidades de planta de cada sitio del muestreo.

Intensidad de la muestra: Porcentaje de plantas muestreada de todo el campo.

Intensidad de la enfermedad: Expresado como incidencia (o frecuencia) o severidad (daño).

Incidencia: Porcentaje de plantas enfermas o parte de la planta enferma de la muestra (o de la población) independiente de la severidad.

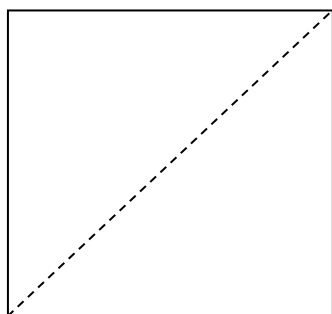
Severidad: Porcentaje relevante del tejido del huésped o del órgano de la planta cubierto con los síntomas (o lesiones) de la enfermedad.

La severidad resulta del número y tamaño de las lesiones. Estos dos componentes de la severidad pueden cambiar independientemente durante el progreso de la enfermedad. Cuando el valor de la intensidad es dividido para 100 ella se convierte en: y ($0 < y$) para ser utilizado como un valor que representa la proporción de la infección.

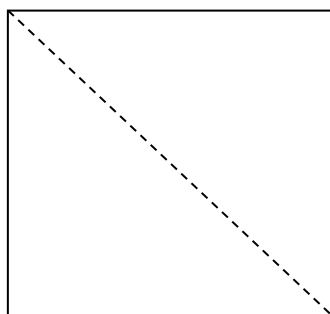
1.2 Diseño de muestreo en campo

Se considerará 12 diseños de muestreos: 1) diagonal con dirección a la derecha, 2) diagonal con dirección a la izquierda, 3) diagonal derecha e izquierda, 4) triple diagonal derecha, 5) triple diagonal izquierda, 6) W con dirección a la derecha, 7) W con dirección a la izquierda, 8) aleatorización estratificada, 9) al azar, 10) siguiendo las manecillas del reloj, 11) alrededor del campo y 12) diamante (CIAT, 1981; Delp et al., 1986; Campbell y Madden 1990).

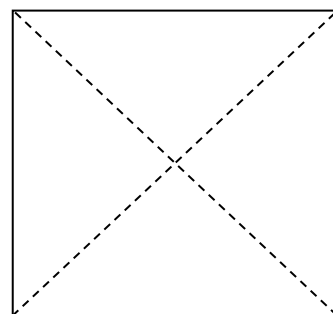
1)



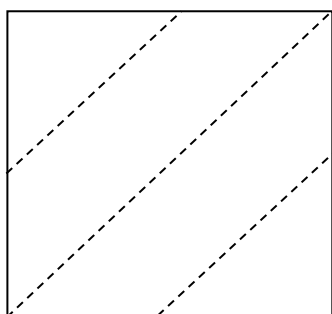
2)



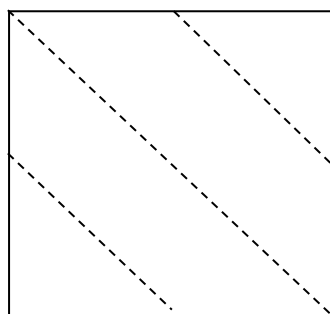
3)



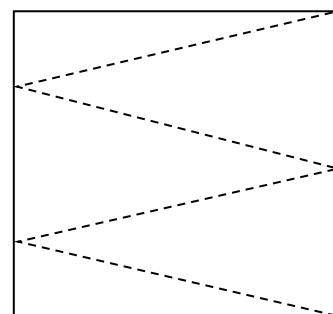
4)



5)



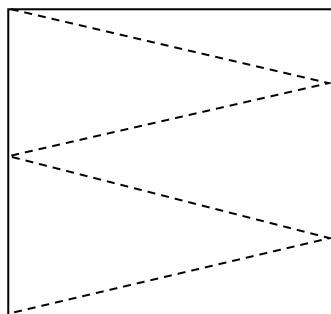
6)



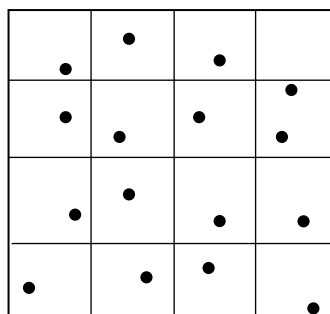
7)

8)

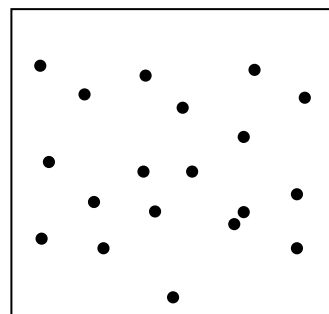
9)



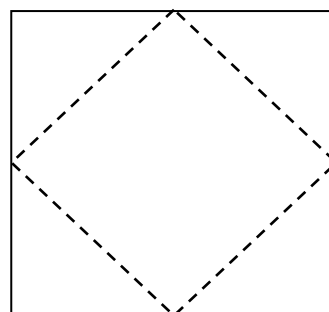
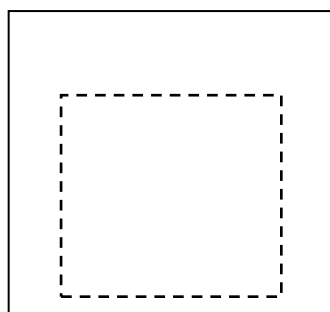
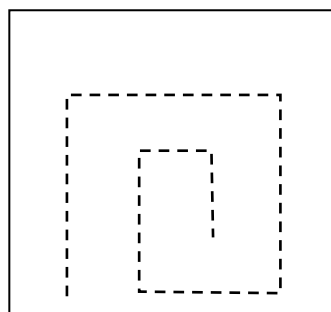
10)



11)



12)



1.3 Tipo de muestra

El tipo de muestra serán las semillas de arroz (espiguillas) y las espigas como tratamiento testigo.

Es importante indicar el siguiente criterio de evento probabilístico: al considerar las espigas la probabilidad de un evento de manchado de semilla será mayor; en relación, a la probabilidad del evento si se considera las semillas por muestra.

1.4 Determinación del tamaño de la muestra

i) *Media de la muestra*

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

ii) *Varianza de la muestra*

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

iii) *Desviación estándar de la muestra*

$$s = \sqrt{s^2}$$

iv) *Error estándar de la muestra de la muestra*

$$S_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

v) *Coeficiente de variación de la muestra o coeficiente de variabilidad de la muestra*

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

vi) *Porcentaje del coeficiente de variación de la muestra o porcentaje del coeficiente de variabilidad de la muestra*

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

1.5 Diseño de un indicador para seleccionar el tamaño de muestra

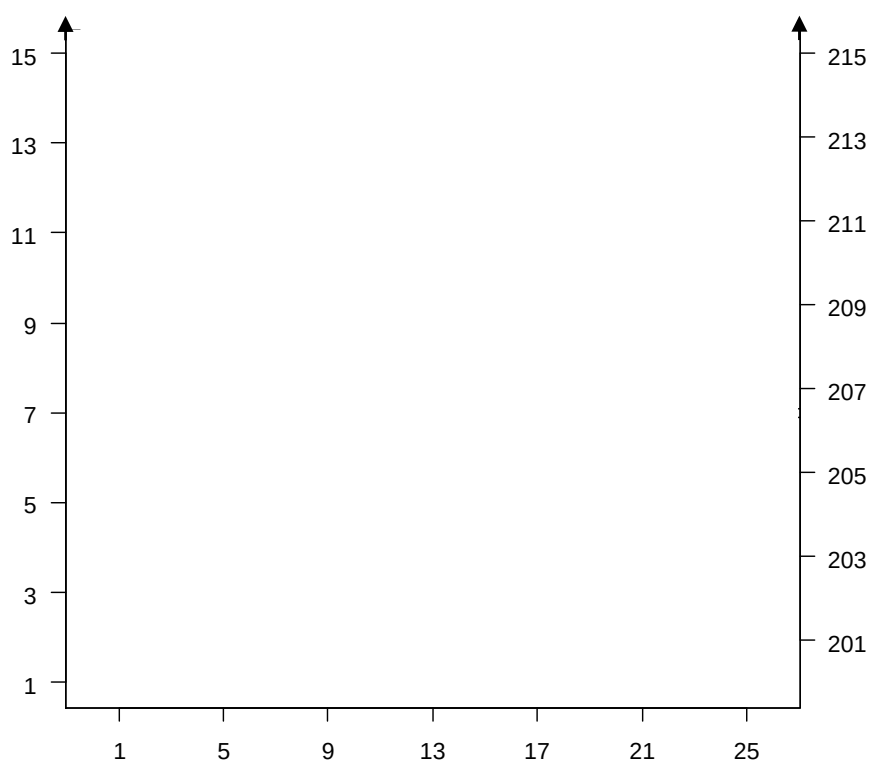
i) *Tamaño de muestra*

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2 \sigma^2}{E^2}; \text{ Donde } E = Z_{\alpha/2} \sigma_y$$

ii) *Tamaño de muestra (x) vs desviación estándar (y) vs media (y')*

Desviación estándar

Media



Tamaño de muestra

iii) *Tamaño de muestra* y aceptación o rechazo de lote de multiplicación *a través de la distribución de Poisson*

Cuando el porcentaje de semilla manchada de arroz es muy bajo, la probabilidad que ocurra semillas de arroz manchada en una muestra se ajusta a la distribución de Poisson.

$$P(y) = \frac{\mu^y e^{-\mu}}{y!}$$

Para la aceptación o, rechazo de un lote de multiplicación de semillas dependerá de los siguientes criterios epidemiológicos y biométricos sugeridos por Geng et al., 1983.

Proporción de enfermedad tolerable (I_t)

Proporción de enfermedad no tolerable (I_{nt})

Probabilidad de aceptar un lote de semilla tolerable ($1-\alpha$)

Probabilidad de aceptar un lote de semilla no tolerable (β)

Cuadro 1. Tamaño de muestra para varios niveles de probabilidad para aceptar un lote de semilla con proporción de enfermedad tolerable (I_t) al 0.05 % y proporción de semilla enferma no tolerable (I_{nt}) al 0.1 %.

β^a	$(1 - \alpha)^b$			
	0.80	0.90	0.95	0.99
0.005	35 947	45 976	53 324	71 267
0.01	31 846	39 308	47 813	63 231
0.05	19 443	25 500	31 415	45 266
0.10	14 206	20 129	24 757	37 199

^a Probabilidad de aceptar un lote de semillas con una incidencia del 0.1% o más de semillas enfermas.

^b Probabilidad de aceptar un lote de semillas con una incidencia del 0.05% o más de semillas enfermas.

Una norma técnica de análisis es la que ha propuesto el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) para la certificación de semilla de arroz; sugiriendo, que, para la calificación de lotes de multiplicación de semilla de arroz, este sea realizado con la evaluación de la severidad de la espiga como se describe en el Cuadro 2.

La evaluación se refiere al modelo que se detalla en la Figura 1 que no se encuentra diagramado en la norma técnica en mención. Esta norma será considerada como testigo.



Figura 1. Porcentaje de espiga cubierta con manchado para trigo propuesta por James, 1971.

Cuadro 2. Evaluación fitopatológica de la categoría de semilla básica, registrada y certificada para variedades e híbridos en condiciones de campo y laboratorio.

Campo - Variedades			
Factores	Categoría de semilla		
	Básica	Registrada	Certificada
Enfermedades transmitidas por semilla %	0	0	0
(excepto) <i>Ustilaginoidea virens</i>	0	0	0.2 %
(excepto) Manchado del Grano	0	1(2) %	3 (5) %
Laboratorio - Variedades			
Enfermedades transmisibles por semillas	0	0	0
<i>Burkholderia</i>	0	0	0.2 %
Campo - Híbridos			
Enfermedades transmitidas por semilla %	N/A	N/A	0

Medición del manchado de la semilla

i) Incidencia de panículas enfermas (%)

$$\text{Panículas enfermas (\%)} = \frac{\text{Número de panículas enfermas}}{\text{Número total de panículas}} \times 100$$

ii) Índice de severidad de panícula manchada

0= Granos no infectados

1= 0.1-10 % de granos infectados

3= 10.1-25.0 % de granos infectados

5= 25.1-50.0 % de granos infectados

7= 50.1-75.0 % de granos infectados

9= Más del 75.1 % de granos infectados

(Huang et al., 2011)

$$100 \times \left(\frac{1}{Pg_{max}} \right) \left(\sum P_i g_i \right)$$

Donde:

P = Número total de panículas observadas

P_i = Número de panículas con grado i

g_i = Valor del grado individual (0 a 9)

g_{max} = Valor del grado máximo

(Huang et al., 2011)

iii) Peso de 1000 semillas producidos por panícula (g)

iv) Incidencia del manchado de la semilla (%)

$$\text{Semillas manchadas (\%)} = \frac{\text{Número de semillas manchadas}}{\text{Total de semillas}} \times 100$$

v) Severidad del manchado de la semilla en 100 g

0 = Sin síntomas

1 = Glumas con pequeñas manchas tipo “cabeza de alfiler”

2 = Manchas alcanzando hasta el 25 % de la superficie de la semilla

3 = Manchas alcanzando del 26 al 50 % de la superficie de la semilla

4 = Manchas alcanzando más del 50 % de la superficie de la semilla

(Malavolta et al., 2007)

vi) Índice de severidad del manchado de la semilla

$$\frac{\sum (\text{Grado} \times \text{Frecuencia})}{\text{Número total de semillas}}$$

vii) Reducción del peso de la semilla (%)

$$\frac{\text{Peso de semilla sana} - \text{Peso de semilla infectada}}{\text{Peso de semilla sana}} \times 100$$

viii). Pérdida de rendimiento (%)

$$\frac{100 \times \text{Reducción peso de la semilla} \times \% \text{ de panículas infectadas}}{\text{Peso de semilla de 50 panículas sanas} \times 100}$$

2. Análisis de correlación con el tipo de carbohidrato e incidencia de especies de hongos y bacterias asociadas con el manchado de la semilla en arroz.

2.1 Incidencia de hongos en semillas

Se procederá a incubar por el método de cámara húmeda 400 semillas en grupos de 50 semillas/cajas Petri (13.5 cm diámetro interno x 2.0 cm de altura externa). La manifestación de desarrollo del micelio, presencia de estructuras de hongos y síntomas asociados a daños por este organismo serán indicativos para proceder con la identificación taxonómica del hongo con el empleo de las claves de Barnett y Hunter (2003) y Carmichael et al. (1980). Para la observación microscópica se utilizará el microscopio óptico de luz Zeiss Primostar 3.

La información y los datos serán llevados a abundancia relativa para cada especie de hongo identificado de acuerdo con el siguiente procedimiento matemático.

$$\frac{\text{Número total de colonias de un género o especie de hongo}}{\text{Número total de colonias de todos los géneros o especies de hongos}} \times 100$$

2.2. Identificación de bacterias en semillas

Para la identificación de bacterias en semillas se seguirán los siguientes pasos: i) aislamiento de la bacteria de la semilla; ii) caracterización de la bacteria aislada de la semilla y iii), ensayos de sensibilidad y tolerancia (Schaad, 1982).

Las bacterias *Acidovorax avenae*, *Burkholderia glumae*, *Pantoea*, *Pseudomonas ananatis*, *P. parafulva*, *P. fulva*, *P. fuscovaginae*, *P. putida*, *P. psychrotolerans*, *P. straminea*, *P. stutzeri*, y *Xanthomonas oryzae* serán consideradas en el estudio por estar asociadas al daño por manchado, esterilidad (vaneamiento) (EPPO (2007); Duveiller et al., 1990; Cortesi et al. (2008); Paz et al. (2018).

2.3 Análisis de carbohidratos

La semilla de arroz se someterá a un análisis bioquímico para determinar el tipo de azúcar constituido como fuente de carbono para el desarrollo de los hongos y bacteria

6.1 Metodología

Para el método de muestreo y tamaño de muestra se tomarán como referencia las investigaciones que realizaron Karandinos (1976); Lin et al. (1979); Gonzáles y Douglas (1981) y Delp et al. (1986).

Respecto al control de calidad para aceptar o rechazar lote(s) de multiplicación de semilla de arroz se considerará el trabajo de Geng et al., 1983.

El análisis de los contenidos de carbohidratos como amilosa, azúcares (HPLC), azúcares totales, azúcares reductores se realizarán en el Laboratorio de Nutrición y Calidad de Alimentos de la Estación Experimental Santa Catalina.

6.1.1 Características del sitio experimental

6.1.1.1 Ubicación

La investigación tendrá como base de trabajo el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP que se detalla a continuación su información geográfica.

Provincia	Guayas
Cantón	Yaguachi
Parroquia	Virgen de Fátima
Sitio	Estación Experimental Litoral Sur
Coordenadas Geográficas	S: 02° 15'26.09'' / O: 079° 38'40.80''

6.1.2 Factores en estudio

- i) Incidencia del manchado del grano en semilla de arroz
- ii) Severidad del manchado del grano en semilla de arroz
- iii) Incidencia del manchado del grano en semilla de arroz por hongos
- iv) Incidencia del manchado del grano en semilla de arroz por bacterias
- v) Incidencia de daño en la espiga por la enfermedad viral de la hoja blanca
- vi) Tipo de carbohidratos en semilla de arroz vs la incidencia de hongos vs la incidencia de bacteria

6.1.3 Unidad experimental

Como unidad experimental se tomará como referencia una superficie arbitraria del lote de multiplicación de semilla de arroz de la Estación Experimental Litoral Sur o, lote(s) de las empresas multiplicadoras de semilla para proceder con la aplicabilidad del tipo de diseño de muestreo y con la obtención de las respectivas submuestras.

6.1.4 Tratamientos

Se definirá como tratamiento los 12 diseños de muestreo. De acuerdo a los diseños de muestreo planteados; a cada uno de los muestreos, se procederá a realizar el submuestreo (parada de colecta) de semilla de arroz.

6.1.5 Diseño experimental

No se empleará diseño experimental por la naturaleza de la investigación a ser ejecutada.

6.1.6 Análisis estadístico

Para efecto del análisis de los datos se utilizará la probabilidad de la distribución, inferencias de μ , inferencias de $\mu_1 - \mu_2$, distribución de frecuencia discreta, inferencia de la varianza de la población $\sigma^2_x = E(X^2) - [E(X)]^2$ y correlación $\rho(X, Y)$, ρ_{xy} .

6.2 Manejo específico del experimento y métodos de evaluación

La evaluación para tomar la información y los datos de las variables en los lotes de multiplicación de semilla será con las sugerencias y recomendaciones de Ott (1993); Sokal y Rohlf (1995).

La entrada de la información y los datos serán llevados a un computador que dispone los paquetes informáticos para el análisis biométrico de las mismas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnett, HJ; Hunter, BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4ta Edición. APS Press. 218 p.

Campbell, CL; Madden, LV. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons. 532 p.

Carmichael, JW; Kendrick, WB; Connors, IL; Sigler, L. 1980. Genera of Hyphomycetes. 386 p. 4

Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1981. Producción y Beneficio de Semilla de Arroz; guía de estudio para ser usada como complemento de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema. Contenido Científico: González, Joaquín y Douglas Johnson. Producción: Arregocés, Oscar. Cali, Colombia. CIAT. 30 p. (serie 04SR-01.08)

Cortesi, P; Bartoli, F; Pizzatti, C; Bertocchi, D; Schaad, NW. 2008. Panicle sterility and grain discolouration: New and emerging bacterial diseases of rice in Italy. En: *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens-identification, epidemiology and genomics. Eds. M'B. Fatmi et al. p. 391-412

Cottyn, B; Debode, J; Regalado, E; Mew, TW; Swings, J. 2009. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. Journal of Applied Microbiology 107:885-897

Delp, BR; Stowell, LJ; Marois, JJ. 1986. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. Phytopathology 76(12):1299-1305

Duveiller, E; Notteghem, JL; Rott, P; Snacken, F; Maraite, H. 1990. Bacterial sheath Brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Madagascar. Tropical Pest Management 36(2):151-153

Geng, S; Campbell, RN; Carter, M; Hills, FJ. 1983. Quality-control programs for seedborne pathogens. Plant Disease 67(2):236-242

Halloin, JM. 1986. Microorganisms and seed deterioration. En: Physiology of seed deterioration. Eds. MB McDonald Jr; CJ Nelson. Madison, USA. P. 89-99

Huang, S-W; Wang, L; Liu, L-M; Tang, S-Q; Zhu, D-F; Savary, S. 2011. Rice spikelet rot disease in China – 1. Characterization of fungi associated with the disease. Crop Protection 30:1-9

Huang, S-W; Wang, L; Liu, L-M; Tang, S-Q; Zhu, D-F; Savary, S. 2011. Rice spikelet rot disease in China – 2. Pathogenicity test, assessment of the importance of the disease, and preliminary evaluation of control options. Crop Protection 30:10-17

James, WC. 1971. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. Canadian Plant Disease Survey 51(2):39-65

Karandinos, MG. 1976. Optimum sample size and comments on some published formulae. Bulletin of the Entomological Society of America 22(4):417-421

Lee, SC; Alvenda, ME; Bonman, JM; Heinrichs, EA. 1986. Insects and pathogens associated rice grain discoloration and their relationship in the Philippines. Korean J. Plant Port. 25(2):107-112

Lin, CS; Poushinsky, G; Mauer, M. 1979. An examination of five sampling methods under random and clustered disease distributions using simulation. Canadian Journal Plant Science 59:121-130

Malavolta, VMA; de Arruda Soligo, E; Dias, DD; Azzini, LE; Bastos, CR. 2007. Incidência de fungos e quantificação de danos em sementes de genotipos de arroz. Summa Phytopathologica 33(3):280-286

Ou, SH. 1972. Rice diseases. Editorial C.A.B. 368 p.

Ott, RL. An introduction to statistical methods and data análisis. 4ta. Edición. Duxbury Press. 1051 p.

Paz, L. 2023. Enfermedades comunes en el cultivo de arroz en Ecuador. Yaguachi, EC, Estación Experimental Litoral Sur. 20 p. (Manual No. 118)

Schaad, MV. 1982. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. Plant Disease 66(10):885-890

Sokal, RR; Rohlf, FJ. 1995. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 3ra. Edición. W.H. Freeman and Company. 887 p.

Schaad, NW; Donldson, RC. 1980. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seed. Seed Science Technology 8:383-392

Xanthomas oryzae. Diagnostic. 2007. En: European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Bulletin 37:543-553

Xie, GL; Mew, TW. 1998. A leaf inoculation method for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* from rice seed. Plant Disease 82(9):1007-1011

1. ACTIVIDAD 2. Identificación por morfología estructuras reproductivas de un hongo asociado a la patología de la muerte descente (muerte regresiva) en cacao.

Responsable:	Paz Carrasco Lenin
Colaboradores:	Pérsenal Técnico del Programa de Cacao y Fruticultura
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Fondos fiscales
Institución donante:	INIAP
Número de memorando:	Se planifica el desarrollo de un protocolo de investigación sobre esta enfermedad abarcando varias especies de frutales y arbóreos. Es importante primero determinar la especie predominante o prevaleciente de Botryosphaeriaceae. Esta información servirá como punto de partida para comprender el estado actual de la enfermedad en estas especies y evaluar la necesidad de estudios adicionales.

1.1 ANTECEDENTES

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Ecuador es de gran importancia socio-económica y fuente de divisas por su exportación. Se tiene estimado que en el país existen 509,179 ha sembradas con una producción promedio de 337,149 t (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2022).

Esta especie vegetal es susceptible a infecciones por *Phytophthora* spp., *Moniliophthora perniciosa*, *M. roreri*, *Ceratobasidium theobromae* y, por varias especies virales (Marelli et al., 2019).

En las plantaciones cacaoteras del país es notorio observar unidades de árboles muertos. Análisis microscópicos preliminares realizados en el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Litoral Sur determinaron presencia de picnidios y picniosporas relacionadas a *Lasiodiplodia*.

Un relato de Goos et al. (1961) mencionan que *Lasiodiplodia theobromae* (= *Botryodiplodia theobromae*) fue descrito por primera vez por Patouillard en 1892 en plantaciones de cacao de Ecuador.

Lasiodiplodia tiene la facultad de afectar varios cultivos como: aguacate, cítricos, duraznos, guanábana, mango, papaya, plátano, uva, etc. Los síntomas de esta enfermedad se manifiestan con muerte descendente, cáncer, gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz en plantas maderables y cultivos (Picos-Muñoz et al., 2015).

Estos investigadores resaltan que *Lasiodiplodia* es un saprófito; pero, es un patógeno latente al encontrarse como endófito en los tejidos sanos de la planta. Su activación como parásito se da cuando la planta está fisiológicamente débil o estresada.

De acuerdo a lo indicado, el estrés por sequía en *Cornus florida* (árbol ornamental común en hemisferio norte) presentó una correlación positiva de una infección asociada por *Lasiodiplodia* (Mullen et al., 1991).

En mango los géneros de Botryosphaeriaceae *Neofusicoccum* y *Lasiodiplodia* son los causales directos de esta enfermedad Ismail et al. (2012); Ismailnet al. (2013).

1.2 OBJETIVO

Realizar un análisis de prevalencia del organismo causante de la enfermedad de la muerte regresiva (muerte descendente) en cacao y en otras especies arbóreas comestibles.

1.3 METODOLOGÍA

Para el diagnóstico de la enfermedad por *Lasiodiplodia*, se emplearon árboles de cacao y especies vegetales con síntomas de secamiento de ramas, muerte total de la unidad productiva, presencia de frutos ennegrecidos, gomosis y otros que la literatura indica (Karunanayake y Adikaram, 2020).

Las muestras (ramas) fueron recolectadas de los cantones de Bucay, Guayaquil, Caluma y Urdaneta, cada una fue etiquetada y conservada en fundas de papel hasta su traslado al Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP.

En el Laboratorio, a cada muestra se extrajo una sección de 10 cm de largo y se expuso a cámara húmeda y se las mantuvo en condiciones ambientales laboratorio (25 ± 1 °C) hasta el desarrollo de estructuras reproductivas del hongo.

Las observaciones de las estructuras reproductivas (picnidios) se realizaron por medio del estéreo microscopio Olympus SZ y los conidios (picniosporas) en el microscopio óptico de luz Zeiss Primostar 3 con objetivo de 40X.

Para cada aislado, se evaluó 30 picniosporas considerando la pigmentación, presencia de septa, grosor de la pared y, largo y ancho de la misma.

La obtención del dato promedio y el error estándar del largo y ancho de las picniosporas se analizaron con el software Navure (versión de prueba).

Las muestras originales se las conservan en el Laboratorio de Fitopatología para el posterior aislamiento del hongo para las pruebas de patogenicidad y análisis molecular y filogenético.

1.4 RESULTADOS

De las cuatro muestras que se colectaron solo una desarrolló estructuras reproductivas asexuales. Las características de las picniosporas maduras corresponden a *L. theobromae*, al observarse una morfología ovoide, pigmentadas, con una sola septa horizontal pronunciada y oscura en su centro, borde café oscuro, superficie con estrías longitudinales y, con medidas de 22.44×12.28 μm (proporción: 1.83). El dato que se obtuvo corresponde a lo descrito por Pavlic et al. (2004); Burgess et al. (2006) y Alves et al. (2008) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Referencias taxonómicas de la especie de *Lasiodiplodia* (= *Botryodiplodia*) *theobromae*

Referencias taxonómicas			
	Pavlic et al. 2004	Burguess et al. 2006	Alves et al. 2008
<i>Botryodiplodia theobromae</i>			
Pat.		<i>L. theobromae</i>	<i>L. theobromae</i>
	(25-35 x 12-15) μm ;	(15-35 x 10-15) μm	(26.2-27 x 14-14.4) μm
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>		(17-33 x 10-15) μm	
(Pat.) Griffon & Maubl.			

(20-30 x 11-15) μm

1.5 CONCLUSIONES

Las afectaciones de muerte de planta regresiva (descendente) están relacionadas a infecciones por *L.theobromae*.

1.6 RECOMENDACIONES

- i) Continuar con muestreos sistemáticos para determinar la prevalencia y la distribución de *L. theobromae* en cultivos de tejido leñoso en especies de frutales.
- ii) Realizar caracterización morfológica de acuerdo con los criterios taxonómicos de los tratados de micología.
- iii) Realizar un estudio genético de la región conservada para confirmar la especie y, la determinación de los parámetros evolutivos y filogeográficos.
- iv) Realizar un análisis abiótico de la condición del estrés en plantaciones evaluadas que favorezcan la expresión de la muerte descendente.
- v) Realizar análisis de virulencia y ensayos de patogenicidad en sus respectivos hospederos.

1.7 REFERENCIAS

Burgers, T; Barber, PA; Mohali, S; Pegg, G; Beer, W; Wingfield, MJ. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. From the tropics, recognized base don DNA sequence comparisons and morphology. Mycology 98(3):423-435

Estado del cultivo de cacao en el Ecuador 2022. En: Boletín Situacional Cultivo de cacao. Ministerio de Agricultura y Ganadería/Coordinación General de Información Nacional Agropecuaria (eds). http://sipa.agricultura.gob.ec/boletines/situacionales/2022/boletin_situacional_cacao_2022.pdf

Goos, RD; Cox, EA; Stotzky, G. 1961. *Botryodiplodia theobromae* and its association with Musa species. Mycologia 53(3):262-277

Ismail, AM; Cirvilleri, G; Polizzi, G; Crous, PW; Groenewald, JZ; Lombard, L. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. Australasian Plant Pathology 41:649-660

Ismail, AM; Cirvilleri, G; Lombard, L; Crous, PW; Groenewald, JZ; Polizzi, G. 2013. Characterisation of *Neofusicoccum* species causing mango dieback in Italy. Journal of Plant Pathology 95(3):549-557

Karunanayake, KOLC; Adikaram, NKB. 2020. Stem-end rot in major tropical and sub-tropical fruit species. Ceylon Journal of Science 49:327-336

Marelli, JP; Guest, DI; Bailey, BA; Evans, HC; Brown, JK; Junaid, M; Barreto, RW; Lisboa, DO, Puig, AS. 2019. Chocolate under threat from old and new cacao diseases. *Phytopathology* 109(8):1331-1343

Mullen, JM; Gilliam, CH; Hagan, AK; Morgan-Jones, G. 1991. Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. *Plant Disease* 75(9):886-889

Pavlic, D; Slippers, B; Coutinho, TA; Gryzenhout, M; Wingfield, M. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50:313-322

Picos-Muñoz, PA; García-Estrada, RS; León-Félix, J; Sañudo-Barajas, A; Allende-Molar, R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control (*Lasiodiplodia theobromae* in agricultural crops in Mexico: Taxonomy, host, diversity and control). *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(1):54-74

2. Actividad 3. Reacción de cinco materiales de arroz a la enfermedad de la mancha agregada de la vaina en arroz.

Responsable:	Paz Carrasco Lenin
Colaboradores:	Celi Herán Roberto Valle Choez Anthony Panchana Torres Carolina Mosquera, Edinson
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Desarrollo e implementación de tecnologías productivas en el cultivo de arroz, para aumentar la resiliencia de pequeños y medianos productores al cambio climático en Ecuador
Institución donante:	FIASA
Número de memorando:	

2.1 ANTECEDENTES

La enfermedad de la mancha agregada de la vaina causada por *Ceratorhiza oryzae-sativae* = *Rhizoctonia oryzae-sativae* (*Sclerotium oryzae-sativae*) su estudio fue iniciado en el 2023 al presentarse por primera vez en los campos experimentales del Programa de Arroz de la Estación Experimental Litoral Sur.

Tomando como referencia a *Rhizoctonia solani*, su grado de virulencia puede llegar a causar daños significativos al cultivo del arroz; que, en dependencia del estado fisiológico de la planta y, de las condiciones ambientales, las pérdidas de rendimiento alcanzarían hasta un 50 % (Singh et al., 2016).

En nuestro medio se han iniciado ensayos de infección en condiciones controladas para medir la reacción genética de las variedades de arroz al patógeno y conocer más sobre esta enfermedad emergente.

2.2 OBJETIVO

Evaluar en condiciones de invernadero la enfermedad de la mancha agregada en el cultivo de arroz.

2.3 METODOLOGÍA

Para la inoculación biológica se procedió inicialmente a obtener su micelio desarrollado en papa-dextrosa en agitación constante por una semana en condiciones ambientales normales de temperatura del Laboratorio de Fitopatología. Para efecto de esta inoculación que se realizó a lo 35 días después de la siembra (dds), se utilizaron las variedades de arroz Cristalino, Élite, Impacto, INIAP 20 y Arenillas.

La inoculación consistió en depositar una masa de micelio entre la vaina de la hoja y tallo quedando posteriormente protegido con papel de aluminio estéril y sostenido con cinta plástica.

Las plantas inoculadas se las mantuvieron por una semana en condición de cámara húmeda apoyado con un humidificador. Posteriormente, a las plantas inoculadas se le dio un seguimiento periódico hasta la manifestación de los síntomas.

Se evaluó la altura de planta y de la lesión para determinar la proporción de daño de la enfermedad.

La reacción genética de resistencia a la enfermedad fue considerada según los criterios calificativos de Chen et al. (2014) y del CIAT (1983) para *R. solani* (Cuadro 1 y 2).

Respecto a Chen et al. (2014), ellos determinaron primero el índice de la enfermedad: (Altura de Lesión / Altura de Planta) x 9. Este dato fue determinado a los 55 días después de la inoculación. El resultado permitió realizar las inferencias genéticas con la escala que se describe a continuación propuesta por estos mismos investigadores:

Cuadro 1: Tipo de reacción genética de acuerdo a la proporción (Altura de lesión/Altura de Planta)

Amplitud del Grado de la Enfermedad	Tipo de Resistencia
≤ 1.5	Alta Resistencia (AR)
1.6 – 3.0	Resistencia (R)
3.1 – 4.5	Moderada Resistencia (MR)
4.6 – 6.0	Moderada Susceptibilidad (MS)
6.1 – 7.5	Susceptibilidad (S)
≥ 7.6	Altamente Susceptible (AS)

Fuente: Chen et al. (2014)

En relación con la escala del CIAT (1983) se consideró el Porcentaje de Área de Planta Afectada (APA) (Cuadro 2)

Cuadro 2: Tipo de reacción genética de acuerdo al porcentaje de área de Planta Afectada (APA)

APA	Tipo de Reacción
0-10	Resistente (R)
Lesiones debajo de la hoja 5	

Variedades	% de daño	REACCIÓN GENÉTICA		
		Índice de la enfermedad	Chen et al. 2009	CIAT
Cristalino	21.85	1.97	R	I
Élite	18.80	1.69	R	R
Impacto	18.58	1.67	R	R
INIAP 20	17.29	1.55	R	R
Arenillas	17.19	1.54	R	R
11-20	Lesiones en la vaina y/o debajo de la hoja 4			Resistente (R)
21-40	Lesiones en la vaina y/o debajo de la hoja 3			Intermedia (I)
41-60	Lesiones en la vaina y/o debajo de la hoja 2			Susceptible (S)
61-100	Lesiones en la hoja bandera o en la vaina debajo de la hoja bandera			Susceptible (S)

Fuente: CIAT (1983)

2.4 Resultados

2.4.1 Reacción genética de los materiales de arroz

La variedad Cristalino presentó el mayor porcentaje daño por *C. oryzae-sativae*. De acuerdo con Chen et al. (2009) este material es resistente; y, según la escala del CIAT presenta una reacción intermedia entre resistente y susceptible (Cuadro 1)

2.5 CONCLUSIONES

1. La variedad Cristalino demostró tener una mayor proporción de daño por *C. oryzae-sativae*.
2. Las variedades Élite, Impacto, INIAP 20 y Arenillas la proporción de daño expresado son resistentes a la infección por *C. oryzae-sativae*.
3. Su reacción genética deberá ser definida con una escala ajustada al patógeno

2.6 RECOMENDACIONES

1. Realizar inoculación biológica controlada en diversas variedades de arroz tipo indica y japónica del Programa de Arroz de la Estación Experimental Litoral Sur para determinar su reacción genética comparativa a los patógenos *Rhizoctonia* y *Ceratorhiza*.

2.7 REFERENCIAS

Chen, B; Li, L-W; Lin, Y-J; Wang, Z-H; Lu, G-D. 2014. Evaluation of seedling resistance of rice germplasm resources to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). Cereal Research Communications 42(3):495-502

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1983. Sistema de Evaluación para Arroz. 2ª. Ed. Manuel Rosero (traductor y adaptador). Cali, Colombia

Moore, RT. 1989. *Ceratorhiza oryzae*, a new combination for the anamorph of *Cerbasidium setariae*. *Anthonie van Leeuwenhoek* 55:393-395

Vignesh, P; Sarda, D; Bireswar, S; Nongdrenkhomba, S; Sobita, D; Tampakleima, W; Dinesh, K. 2023. First report of *Ceratorhiza oryzae-sativae*, a fungus naturally causing aggregate sheath spot disease of rice in Manipur. *Ecology, Environment and Conservation Journal* 29(1):367-369

3. Actividad 4. Evaluación de materiales de arroz a la enfermedad del entorchamiento.

Responsable:	Paz Carrasco Lenin
Colaboradores:	Celi Herán Roberto Valle Choez Anthony Panchana Torres Carolina Mosquera, Edinson
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Desarrollo e implementación de tecnologías productivas en el cultivo de arroz, para aumentar la resiliencia de pequeños y medianos productores al cambio climático en Ecuador
Institución donante:	FIASA
Número de memorando:	

3.1 ANTECEDENTES

La enfermedad del entorchamiento del arroz es causada por la especie viral *Rice stripe necrosis virus* (RSNV) transmitido (vector) por el fitomixido del suelo *Polymyxa graminis* (*Px. graminis*). Desde su apareamiento en Ecuador en la década del 2000, el Laboratorio de Fitopatología y el Programa de Arroz de la Estación Experimental Litoral Sur han llevado periódicamente ensayos experimentales en condiciones de invernadero y campo para evaluar la condición genética de los materiales de arroz (Paz, 2019; Paz y Celi, 2023).

Esta enfermedad promueve en la planta de arroz una distorsión y, su agresividad va a depender del grado de reacción genética del material de arroz.

OBJETIVO

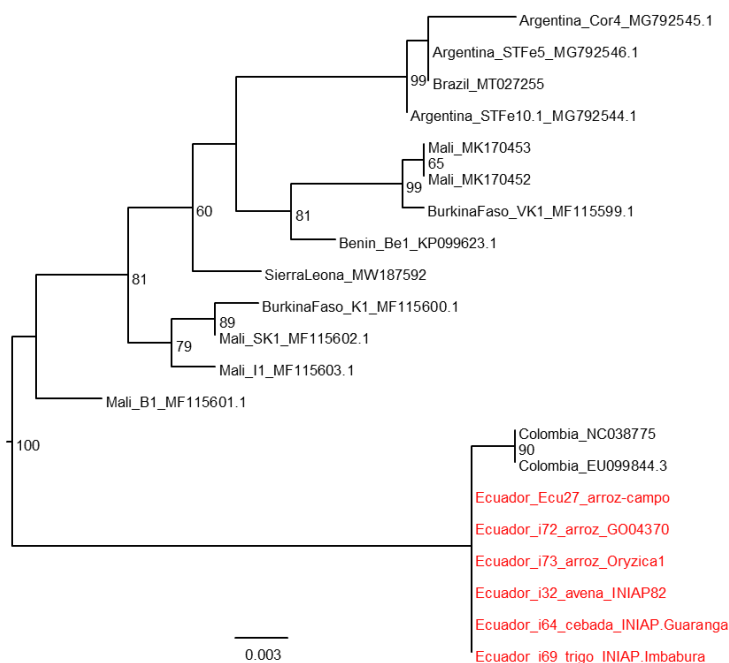
Realizar un análisis preliminar de la estructura genética geográfica del RSNV derivado de cereales comestibles.

3.2 METODOLOGÍA

Variedades de cereales comestibles como el arroz, avena, cebada y trigo se sembraron en suelo infestado naturalmente con *Px. graminis* infectivos con el RSNV. Aquellas plantas que manifestaron los síntomas de la enfermedad del entorchamiento se sometieron a un análisis molecular de amplificación de 652 pb del componente ARN 2 del virus previo a una retrotranscripción (RT-PCR). Los productos amplificados se sometieron a un secuenciamiento por el método de Sanger.

3.3 RESULTADOS

Se demostró que la infección corresponde al RSNV y que las secuencias genéticas del RSNV de Ecuador provenientes de arroz, avena, cebada y trigo que, al compararlas con las secuencias genéticas de Argentina, Benin, Brasil, Burkina Faso, Colombia y Mali; se relacionaron genéticamente con los aislados de Colombia.



3.4 CONCLUSIONES

1. El RSNV se estructuró genéticamente con aislados de Colombia.
2. El RSNV tiene la capacidad de infectar otros cereales comestibles distintos al arroz.
3. *Polymyxa graminis* tuvo la capacidad de transmitir el RSNV a otras especies de cereales comestibles.

3.5 RECOMENDACIONES

1. Analizar con probilidad X^2 la expresión de cada síntoma para determinar la proporción alélica de cada material de cereal.
2. Realizar análisis de la estructura genética de poblaciones del virus y del vector para comparar alelos de otras localidades geográficas donde se presenta la enfermedad del entorchamiento.

3.6 REFERENCIA

Paz, L. 2019. Entorchamiento del Arroz. INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ecuador) / SENESCYT (Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, Ecuador) / PNUD (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Ecuador). Yaguachi, Guayas, Ecuador. 6 p. (Plegable No. 442)

Paz, L; Peñaherrera-Colina, L; Carrillo, M; Cuaycal, A. 2020. Manejo sostenible del cultivo de arroz en ambientes con pesencia de entorchamiento. Yaguachi, EC, Estación Experimental Litoral Sur. 10 p. (Boletín Divulgativo No. 447)

Paz, L; Celi, R. 2003. *Polymyxa graminis*, vector del *Rice stripe necrosis virus*: su impacto y estrategia de manejo en el cultivo de arroz. Yaguachi, EC, Estación Experimental Litoral Sur. p.10 (Boletín Divulgativo No. 452)

Paz, L; Pinault, A; Poulicard, N; Hébrard, E; Jaffré, E-L; Celi, R; Valle, A; Panchana, C. 2024. Potencial impacto de la enfermedad viral del “entorchamiento” en cereales en Ecuador. Yaguachi, EC, Estación Experimental Litoral Sur. 10 p. (Boletín Técnico No. 192)

4. Actividad 5. Caracterización molecular, y microbiológica de aislados bacterianos asociados a la Pudrición del Cogollo (PC).

Responsable:	Paz Carrasco Lenin
Colaboradores:	Ortega Cedillo, Digner Zambrano, Silvia Madelein Navarrete, Mercedes Elizabeth Panchana Torres, Carolina
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Enfermedades Letales en la Palma Aceitera en Ecuador
Institución donante:	FIASA
Número de memorando:	

4.1 ANTECEDENTES

La Pudrición del Cogollo (PC) es una enfermedad devastadora que afecta a las plantaciones de palma aceitera en Ecuador y otros países de América Latina. Se caracteriza por la pudrición de los tejidos jóvenes en el cogollo, lo que conlleva a la muerte de la planta. Los primeros casos de PC en Ecuador se reportaron en 1976 en la región amazónica en la plantación “Palmera de los Andes” en palmas de tres a cuatro años de edad (Carrillo *et al.*, 2015). Desde entonces, la enfermedad ha provocado una creciente mortalidad de palmas y significativas pérdidas económicas, con una reducción del 85% en la producción nacional (ANCUPA, 2014).

En el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Litoral Sur (EELS), la Pudrición del Cogollo (PC) ha sido objeto de investigación desde el año 2014, con el apoyo del Programa de Palma Africana de la Estación Experimental de Santo Domingo (EESD). Se han realizado muestreos en diversas plantaciones afectadas o con sospecha de la PC, en las zonas de La Concordia, Quinindé y Santo Domingo, identificando la presencia de diversos organismos asociados con la enfermedad.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Recolección de muestras

La toma de muestras para el aislamiento de bacterias se realizó a partir del material vegetal (cogollo, flecha, semilla e inflorescencia) afectado con PC en dos plantaciones de Palma Aceitera ubicadas en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Esmeraldas.

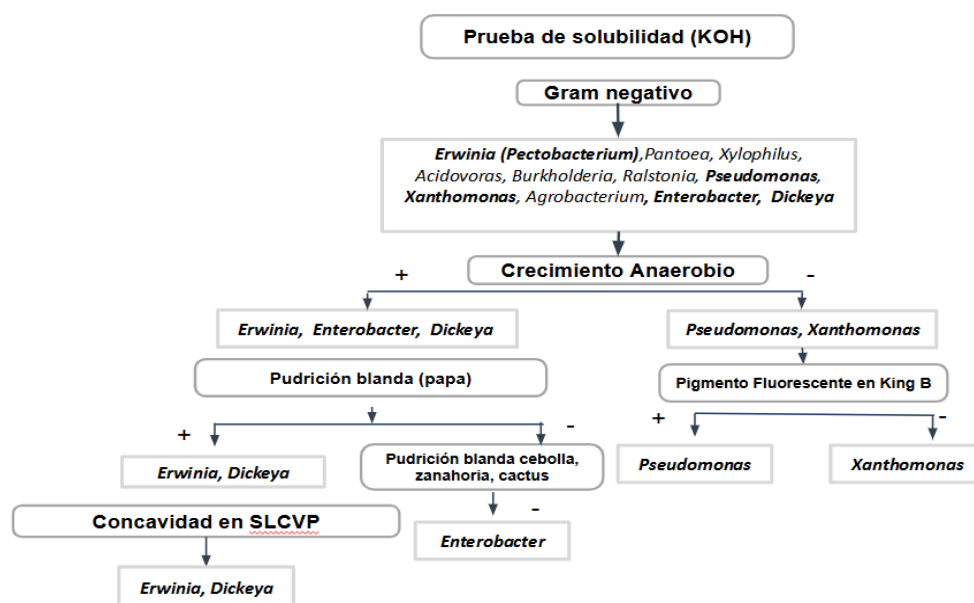
4.2.2 Aislamiento de bacterias

El tejido vegetal colectado, fue cortado aproximadamente en trozos de 1 cm x 1 cm considerando la línea de avance de la infección y desinfectados con alcohol al 50%, cloro al 0.7 % y tres lavados con agua destilada autoclavada (ADA), las muestras fueron resuspendidas *overnight* en ADA en condiciones de agitación y a 27°C. Al día siguiente se sembró 100 uL de la suspensión bacteriana en medio agar nutritivo (AN) y KADO, se incubó a 27°C. Las colonias observadas fueron purificadas en medio AN.

4.2.3 Identificación de posibles bacterias patogénicas mediante el esquema de Schaad

Los aislados bacterianos purificados se evaluaron siguiendo el esquema modificado de Schaad (Figura 1). Inicialmente, se diferenciaron las bacterias Gram positivas de las Gram negativas mediante la prueba de solubilidad en KOH. Las bacterias Gram negativas fueron sometidas a la prueba de anaerobiosis, complementada con la prueba de catalasa. Aquellas clasificadas como anaerobias facultativas fueron evaluadas mediante pruebas de pudrición en diferentes sustratos (papa, zanahoria, cebolla y cactus). Por otro lado, las bacterias aeróbicas obligadas se cultivaron en medio King B para determinar la producción de pigmento fluorescente.

Figura 1. Esquema modificado de Schaad



Nota: Medio SLCVP: *Simple layer crystal violet pectate*

4.2.4 Extracción de ADN y amplificación or PCR de los aislados bacterianos

Una vez obtenidos los aislados mediante las pruebas de *Schaad*, se procedió a la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) utilizando solventes orgánicos (cloroformo-álcohol isoamílico). El ADN obtenido fue resuspendido en tampón TE 1X. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región 16S, empleando los cebadores especificados en el cuadro 1. Los amplicones generados fueron purificados, cuantificados en (ng/μL) y finalmente enviados para su secuenciación mediante la técnica de Sanger.

Cuadro 1. Cebadores usados para la amplificación de la región altamente conservada 16S

Región genómica	Cebador	Secuencia 5' -3'	Tamaño del amplicón	Referencia
Región hipervariable 16S (V3-V4)	341 F	CCTCGGGNGGCWGCAG	444 pb	Klindworth <i>et al.</i> , (2012)
	785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC		
Región 16S (V1 –V9)	27 F	GAGTTTGATCATGGCTCAG	1465 pb	Lane (1991)
	1492R	GGTACCTTGTTACGACTT		

4.2.5 Pruebas bioquímicas para la caracterización de factores virulentos

Una vez identificadas las especies bacterianas, se realizó la caracterización a nivel fisiológico y metabólico usando diversas pruebas bioquímicas siguiendo los protocolos de la *American Society for Microbiology* (2016), indicadas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas efectuadas para la caracterización de aislados bacterianos

Prueba	Objetivo	Resultado	
		Positivo	Negativo
Oxidasa	Determinar si la bacteria produce alguna de las enzimas citocromos c oxidasa	Oxidasa positiva – coloración violeta oscura de 5 a 10 segundos	Oxidasa negativa- si el color no cambia o tarda más de 2 minutos.
Hidrólisis de gelatina	Determinar si la bacteria produce la enzima gelatinasa	La gelatina se mantiene líquida al sacar de la nevera	La gelatina se solidifica.
Utilización de citrato	Determinar si la bacteria utiliza el citrato como fuente de carbono y energía	El crecimiento bacteriano en el medio presentará una coloración azul	No producirá ningún color.
Hidrólisis de urea	Identificar las bacterias que son capaces de hidrolizar la urea para producir amoníaco y dióxido de carbono.	El crecimiento bacteriano en el medio será un rojo intenso	El medio no presenta cambio

Hidrólisis de arginina	Determinar si el aislado bacteriano es capaz de hidrolizar la arginina en anhídrido carbónico y una amina.	Reacción alcalina cambia a color rosado	No se observa coloración
Susceptibilidad antibiótica mediante la técnica del disco	Determinar la resistencia o susceptibilidad de los siguientes antibióticos: Eritromicina 15 mg, Ampicilina 10 mg, Ciprofloxacina 5 mg, Tetraciclina 30 mg, Rifampicina 5 mg.	Observación del halo de inhibición en el medio Mueller – Hinton	Con crecimiento en el medio Mueller – Hinton

4.3 RESULTADOS

A partir de las muestras vegetales de palma aceitera con síntomas de PC, se aislaron 40 colonias bacterianas, las cuales fueron evaluadas según el esquema modificado de *Schaad*. Los resultados de las pruebas, presentados en el Cuadro 3, determinan la presencia de bacterias de los géneros *Enterobacter* spp., *Pectobacterium* spp. y *Pseudomonas* spp., identificándose un total de nueve (9) aislados con posibles características virulentas. El análisis de las secuencias de la región 16S mostraron un porcentaje de identidad superior al 98.37 % para los géneros antes mencionados.

De los nueve aislados obtenidos, cinco pertenecen al género *Enterobacter* spp. En los últimos años este género ha adquirido importancia como patógeno vegetal ya que ha sido asociado a enfermedades como la descomposición interna en la cebolla (Schroeder et al., 2009), amarillamiento interno de la papaya (Nishijima et al., 1987), y afectado a cultivos como orquídeas (Takahashi et al., 1997), yuca (Santana et al., 2012), entre otras.

Cuadro 3. Resultado de las pruebas indicadas en el esquema de *Schaad*

Prueba	Resultado
KOH al 3%	31 bacterias gram negativas y 9 bacterias gram positivas
Anaerobiosis	27 anaerobios facultativos, 4 aerobios obligados
Catalasa	32 positivos
Inoculación en papa	7 pudrición húmeda
Inoculación en zanahoria	4 pudrición húmeda
SLCVP	1 crecimiento cóncavo
Crecimiento en YDC*	-
King B	1 Fluorescencia

Nota: *Medio YDC- (Yeast Dextrose Calcium Carbonate Agar)

Los nueve aislados bacterianos e identificados fueron sometidos a pruebas bioquímicas para evaluar características metabólicas que describan mejor su mecanismo de virulencia. En el Cuadro 4 se observa los resultados de las pruebas evaluados, donde los aislados EELS_5EC, EELS_6EC, EELS_7EC pertenecientes al género de *Enterobacter* spp. fueron positivas para todas las pruebas. Esto indica que la presencia de enzimas como la ureasa, la cual hidroliza la urea en amoníaco y dióxido de carbono aumenta el pH favoreciendo la colonización bacteriana (Rutherford, 2014). De la misma manera la

presencia de la enzima arginina dihidrolasa descompone la arginina en amonio y otros productos alcalinos que puede influir en el pH y afectar las interacciones huésped – patógeno (Acosta et al., 2011).

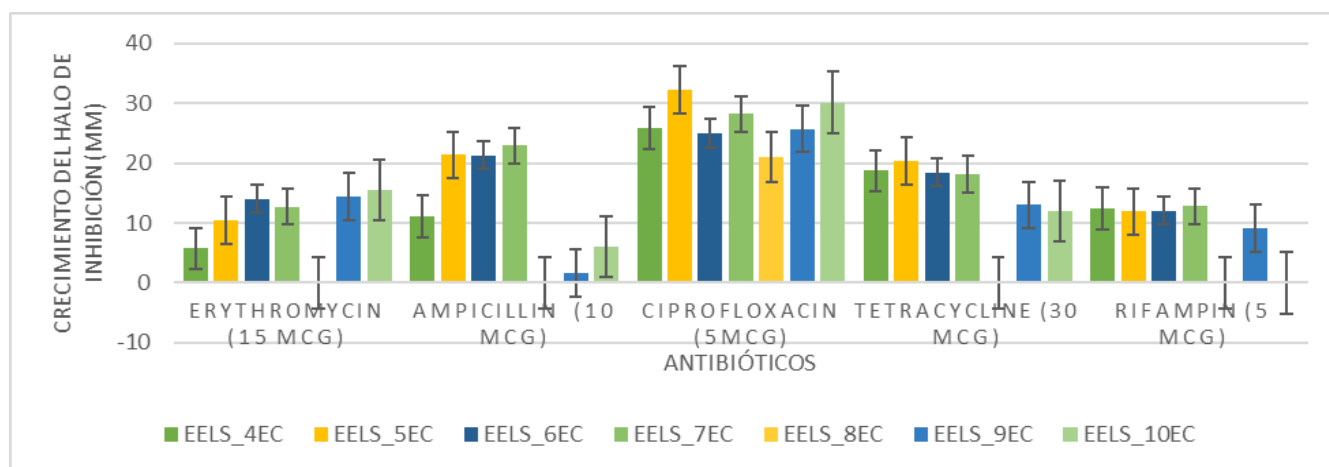
Cuadro 4. Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas en los aislados bacterianos.

Bacteria ID	Citrato	Oxidasa	Arginina	Úrea	Gelatina
EELS_4EC	+	+	+	-	+
EELS_5EC	+	+	+	+	+
EELS_6EC	+	+	+	+	+
EELS_7EC	+	+	+	+	+
EELS_8EC	+	+	+	-	-
EELS_9EC	+	+	-	-	+
EELS_10EC	+	+	-	-	+
EELS_17EC	+	+	+	-	+
EELS_27EC	-	+	+	-	+

Nota: (+): Resultado positivo, (-): Resultado negativo

Para la evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos en el medio Mueller – Hinton, se evaluó el crecimiento (mm) del halo de inhibición utilizando tres discos sembrados en dos cajas petri. En la Figura 2 se observa el promedio y desviación estándar de las mediciones obtenidas. Estos valores se compararon con los criterios establecidos por el CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) para determinar el perfil de resistencia de las bacterias, clasificándolas en tres categorías: resistente, intermedio o susceptible, como se presenta en el Cuadro 5.

Figura 2. Mediciones de la zona de inhibición para diferentes antibióticos





Cuadro 5. Interpretación de la zona de inhibición de las bacterias para los diferentes antibióticos.

Bacteria ID	Erythromycin (15 mcg)	Ampicillin (10 mcg)	Ciprofloxacin (5mcg)	Tetracycline (30 mcg)	Rifampin (5 mcg)
EELS_4EC	R	R	S	I	R
EELS_5EC	R	S	S	S	R
EELS_6EC	I	S	S	I	R
EELS_7EC	R	S	S	I	R
EELS_8EC	R	R	S	R	R
EELS_9EC	I	I	S	R	R
EELS_10EC	I	I	S	R	R

Nota: R: Resistencia, S: Susceptibilidad, I: Intermedia.

4.4 CONCLUSIONES

1. Se logró aislar 40 colonias bacterianas, las cuales fueron testeadas con las pruebas que indica el esquema *Schaad*, identificando la presencia de nueve bacterias con características patogénicas pertenecientes a los géneros *Enterobacter* spp., *Pectobacterium* spp. y *Pseudomonas* spp. Esta identificación fue corroborada con la secuenciación de la región 16S de los aislados bacterianos.
2. Las pruebas bioquímicas permitieron determinar la capacidad de las bacterias pertenecientes al género *Enterobacter* spp para producir enzimas específicas, como la oxidasa, gelatinasa, ureasa y arginina dihidrolasa que actúan como mecanismos de virulencia para la propagación de la infección en la planta.
3. Se determinó que los nueve aislados bacterianos evaluados presentaron resistencia a rifampicina (5 mcg) y, en contraste, todos resultaron susceptibles a Ciprofloxacin (5 mcg).

a. RECOMENDACIONES

Se recomienda aumentar el número de muestras y la diversidad de regiones de muestreo para obtener una representación más amplia de los patógenos asociados a la pudrición del cogollo (PC) en palma aceitera. Esto permitiría identificar patrones epidemiológicos y posibles variaciones en la virulencia de las bacterias aisladas.

5.6 REFERENCIAS

- Acosta, B., María, B., Codina, G., Lurdes, G., María, M. A., & Peinado, A. M. (n.d.). *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón Coordinadora: María Antonia Meseguer Peinado.
- Ancupa 2014. Tomado de: <https://www.dropbox.com/scl/fi/ri157u9jvzb3y5j4eqm0j/REVISTA-25-ANCUPA-PC-baja-9en.pdf?e=1&oref=e&rlkey=2iofvgorfsfv2ggc15ywqyphd>.
- Bernal, G., Ronquillo, M., Vega, C., Bravo, V., & Paredes, E. (2013). *GUÍA DE CAMPO SOBRE LA PUDRICIÓN DE COGOLLO* (C. Pérez, Ed.; 2013th ed.). Ancupa, Agrocalidad . https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/foc21.pdf?utm_source=chatgpt.com
- Clinical Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard— 9th ed. CLSI document M2-A9. 26:1. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dattelbaum J D, Lockatell C V, Johnson D E, and Mobley H L T (2003). Ure A, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infection. *Infect. Immune*. 71(2): 1026-30.
- Klindworth, A., Priesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2012). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based
- Lane, D. (1991). *"Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics,"*. Cnii Research. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1370565169361354123>.
- Nishijima KA, Wall MM, Siderhurst MS. Demostración de la patogenicidad de *Enterobacter cloacae* en macadamia e identificación de los volátiles asociados del grano gris de macadamia en Hawái. *Plant Dis*. 2007;91:1221–1228. doi: 10.1094/PDIS-91-10-1221.
- Rutherford JC. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. *PLoS Pathog*. 2014 May 15;10(5):e1004062. doi: 10.1371/journal.ppat.1004062. PMID: 24831297; PMCID: PMC4022740.
- Schroeder BK, Waters TD, du Toit LJ. Evaluación de cultivares de cebolla para resistencia a *Enterobacter cloacae* en almacenamiento. *Plant Dis*. 2010;94:236–243. doi: 10.1094/PDIS-94-2-0236.

10. Actividades extra POA 2024

Durante el año 2024 el Laboratorio de Fitopatología brindo servicios de identificación de fitopatógeno a diversos agricultores, productores y empresas privadas, en el siguiente cuadro se refleja el número de servicios brindados por mes.

Mes	Número de Servicios
Enero	11
Febrero	1
Marzo	0
Abril	1
Mayo	0
Junio	0
Julio	1
Agosto	1
Septiembre	1
Octubre	10
Noviembre	4
Diciembre	1
Total	31