

Análisis de ergosterol como marcador para la detección temprana de la Pudrición basal del estípite (PBE) en palma de aceite en Colombia

Fausto Prada¹, Mónica Navia¹, Hernán Mauricio Romero^{1,2*}

Notas del Director

Los problemas fitosanitarios del cultivo de la palma de aceite en Colombia siguen siendo la prioridad del sector y también del Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma. El Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma de Aceite trabaja en la búsqueda de soluciones integrales para enfrentar las principales enfermedades de la palma, desarrollando herramientas moleculares para el apoyo y avance de la investigación en la sanidad del cultivo.

En esta publicación presentamos los avances de la investigación sobre el análisis de ergosterol, un esteroide primario específico para hongos, mostrando que el uso de marcadores químicos específicos de los patógenos analizados por cromatografía puede ser una herramienta alternativa y complementaria a otros métodos de detección, también en investigación por Cenipalma, como técnicas moleculares o el uso de imágenes por tomografía, para la detección de *Ganoderma* sp., causante de la Pudrición basal del estípite (PBE).

La PBE se ha reportado en el país con incidencias generales no muy elevadas; sin embargo, con algunos lotes específicos que muestran hasta 12,4% de incidencia. Teniendo en cuenta que con los métodos actuales de detección se descubren las plantas enfermas ya en un grado avanzado de la enfermedad, se debe crear una estrategia de prevención para evitar la dispersión de PBE en el país. Para la detección temprana se requiere un método robusto, rápido y confiable.

La investigación, como la mencionada en este Ceniavances, en un mediano plazo nos permitirá ofrecer al gremio una herramienta confiable, que pueda ser implementada de forma rutinaria para la detección oportuna de la enfermedad.

José Ignacio Sanz Scovino, PhD.
Director Ejecutivo de Cenipalma

Introducción

La enfermedad más importante de la palma de aceite en las plantaciones del Sudeste Asiático es la Pudrición basal del estípite (PBE) (Singh, 1993), que se ha asociado con varias especies del género *Ganoderma*. Se sabe además que algunas especies de *Ganoderma* son los agentes causantes de pudriciones en muchos otros cultivos como el de coco, caucho, té, cacao y guaraná, entre otros (Mohd *et al.*, 2011). En Malasia e Indonesia, los mayores productores de aceite de palma en el mundo, la PBE es responsable de pérdidas económicas enormes debido a la muerte de las palmas infectadas. La enfermedad se hace evidente cuando las palmas tienen de diez a doce años de edad, pero después de la renovación la enfermedad puede aparecer 12 o 24 meses después de la resiembra, aunque es más frecuente cuando las palmas tienen cuatro o cinco años de edad (Singh, 1991).

En Colombia, la PBE se ha reportado en tres de las cuatro zonas productoras (Nieto, 1995; Mestizo *et al.*, 2012). Los datos de incidencia muestran que las zonas Norte y Central tienen valores de 0,27 y 0,083%, respectivamente (Cooman *et al.*, 2013). Sin embargo, algunos lotes específicos de la Zona Central reportaron hasta 12,4% de incidencia (Pulido *et al.*, 2011). No obstante, por las características de la enfermedad se estima que deben existir cientos de palmas enfermas que aún no han sido diagnosticadas. Evitar la dispersión de PBE en el país se debe convertir en una estrategia para evitar desastres tan grandes como los causados por la Pudrición del cogollo. Actualmente, la detección de la PBE se basa en la acumulación de flechas, aparición de hojas bajas dobladas hacia abajo, raíces adventicias y presencia de esporóforos en los troncos o raíces primarias cerca del nivel del suelo (Mestizo *et al.*, 2012). Sin embargo, estos síntomas de detección aparecen cuando la planta ya está en un grado avanzado de la enfermedad. Por lo anterior, se requiere un método robusto, rápido y confiable para la detección temprana.

Se han propuesto métodos como la detección del patógeno por técnicas moleculares (Utomo y Niepold, 2000; Navia *et al.*, 2012) o de las lesiones del estípite usando imágenes por tomografía (Mazliham *et al.*, 2008; Arango y Martínez, 2013). Sin embargo, el uso de marcadores químicos específicos de estos patógenos analizados por cromatografía puede ser una herramienta alternativa y complementaria a los métodos ya propuestos. En este caso nos referimos al análisis de ergosterol (Figura 1). El ergosterol es un esteroide primario específico para hongos y ha sido detectado en otras especies de *Ganoderma* (Yuan *et al.*, 2006). El compuesto se

¹ Programa de Biología y Mejoramiento Genético de Cenipalma, Laboratorio de Biotecnología, La Vizcaína, Barrancabermeja, Colombia.

² Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

* Autor para correspondencia e-mail: hromero@cenipalma.org

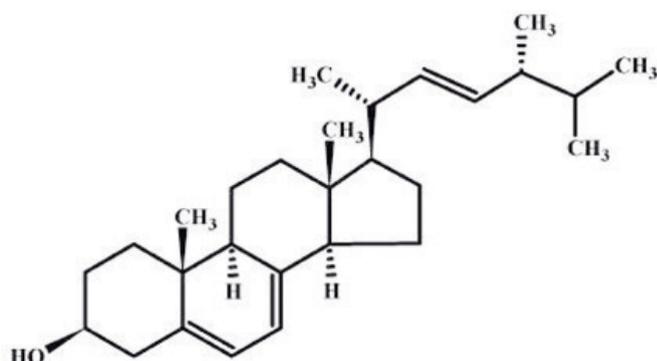


Figura 1. Estructura molecular del ergosterol.

ha utilizado para detectar la invasión de hongos en granos (Dong *et al.*, 2006) y otra variedad de sustratos como las raíces micorrizadas, madera, follaje, suelos y, también, para estimar el avance de la PBE producida por *Ganoderma* en plántulas de palma de aceite (Mohd *et al.*, 2011).

En este sentido, Cenipalma está trabajando en varios frentes para encontrar una forma eficiente de detección temprana y en este reporte se presentan los avances del desarrollo del análisis basado en la detección y cuantificación de ergosterol en los tejidos afectados, como herramienta de diagnóstico temprano de la PBE, lo cual permite eliminar las palmas enfermas antes de que la enfermedad se disemine por toda la plantación y plantaciones vecinas.

Materiales y métodos

Material vegetal

Para la colecta de las muestras, se visitaron tres plantaciones en la Zona Norte: Palmeras de la Costa (Palmas 1 – 5); Macaraquilla (Palmas 6 – 10) y El Roble (Palmas 11 y 12). En total se tomaron muestras de 12 palmas afectadas (Tabla 1). Se definieron los siguientes puntos de toma de muestras para estimar el contenido de ergosterol, zona externa (tejido cercano a la corteza), zona de avance (comprende el halo amarillo alrededor de la lesión), zona necrótica, solo se tomó en una de las palmas erradicadas de la plantación Macaraquilla y muestra de raíz (Figura 2). De cada zona se tomaron tres muestras. Para el control se tomaron tres palmas del Campo Experimental El Palmar de La Vizcaína, donde a la fecha se han reportado ocho palmas en 220 hectáreas sembradas. En este caso se tomó tejido de la zona central del estípote (correspondería a la zona de avance), zona externa (cercana a la corteza) y raíz. Las muestras de estípote y esporóforo se cortaron en trozos, se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron en nitrógeno líquido. Las muestras de raíz, se lavaron, se picaron y también se almacenaron en nitrógeno líquido. Durante este muestreo se colectaron tres esporóforos de la plantación Palmeras de la Costa con la morfología típica de *Ganoderma* sp. (Figura 2). En total se tomaron 144 muestras.

Análisis de ergosterol por HPLC

Las muestras se transportaron al laboratorio de Bioquímica en el Campo Experimental El Palmar de La Vizcaína. El tejido vegetal y

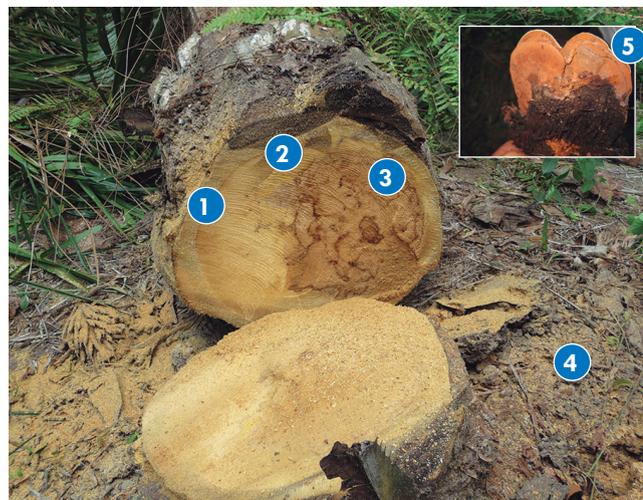


Figura 2. Detalle de los puntos muestreo en el estípote y raíz de las palmas enfermas y esporóforo. 1. Zona externa; 2. Zona de avance; 3. Zona necrótica; 4. Raíces y 5. Esporóforo.

de esporóforo se liofilizaron (Labconco, Kansas, EE.UU.) y se maceraron hasta obtener un polvo fino. El análisis se desarrolló con modificaciones de acuerdo con lo descrito por Mohd *et al.*, (2011), para tejido de palma de aceite usando cromatografía líquida de alta eficiencia (Merck Hitachi, Tokio, Japón). Se tomaron alrededor de 200 mg de tejido seco macerado y se le adicionaron 2 mL de KOH/MeOH 2N para saponificar el tejido y liberar el ergosterol esterificado; luego, se agitó durante 1 h a 80°C. Se dejó enfriar y se adicionaron 3 mL de agua desionizada (Millipore, Sao Paulo, Brasil). Se extrajo tres veces con 3 mL de éter etílico. Se lavó con agua hasta neutralidad y se secó el extracto con flujo de nitrógeno. El extracto que contenía el ergosterol se suspendió en 1 mL de cloroformo (Merck, Alemania) y se filtró a través de un filtro-jeringa de 0,45 µm (Millipore). 20 µL se inyectaron al HPLC. El ergosterol se separó en modo gradiente a 2,5 mL/min usando agua (A) y metanol (B). El gradiente inicial fue de 80 – 100% de B en 8,5 min, 100% de B hasta 14 min, 100 – 80% B a los 15 min y, finalmente, 2 min a las condiciones iniciales. Se usó una columna Merck Chromolith RP18e (100 x 4,6 mm) y el detector se configuró a 282 nm. La cuantificación se realizó comparando el área bajo el pico y usando curva de calibración del compuesto puro.

Resultados y discusión

Se realizó el análisis de ergosterol en los tres esporóforos, los tejidos de zona externa cerca de la corteza, zona de avance y raíces a las doce palmas enfermas y las tres sanas (Tabla 1). Solo se pudo tomar tejido necrótico en la palma seis de Macaraquilla, los resultados no se muestran en la Tabla 1, pero los valores de las muestras tomadas fueron de 94,3 y 98,0 mg ergosterol/kg de tejido seco. Se observó que las mayores concentraciones de ergosterol estuvieron en las tres muestras de esporóforo, con 1991, 2080 y 2957 mg/kg, comprobando que el ergosterol efectivamente hace parte de la estructura del patógeno. En el caso de tejidos del estípote de las palmas enfermas, algunas muestras de la zona externa y de avance tuvieron la presencia del ergosterol y otras

Tabla 1. Valores de ergosterol (mg/kg peso seco) encontrados en los diferentes tejidos de estípite y raíz de palmas sanas y afectadas con PBE y en las estructuras de esporóforo

Palma	Tipo de tejido									
	Palmas con pudrición basal de estipe									
	Externo			Avance			Raíz			Esporóforo
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	-
1	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	8,2	4,4	94,3	2080
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	4,7	6,0	3,8	1991
3	0,0	5,3	0,0	-	-	0,0	6,0	-	7,1	-
4	3,8	-	3,5	0,0	0,0	0,0	4,2	99,8	8,1	2957
5	5,6	-	3,9	0,0	0,0	7,3	44,5	4,1	8,4	-
6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	14,5	44,7	52,6	-
7	3,8	3,9	-	-	0,0	0,0	43,8	9,4	5,8	-
8	3,6	3,9	3,9	17,5	3,9	27,9	5,5	735,3	955,1	-
9	4,2	-	4,2	-	4,9	4,7	935,1	700,2	591,7	-
10	4,4	0,0	0,0	5,1	5,6	-	6,3	47,3	4,4	-
11	4,1	3,7	3,8	-	4,1	0,0	3,5	4,2	4,3	-
12	3,8	3,8	0,0	-	3,7	4,1	3,7	4,0	4,0	-
Promedio [±]	2,3 (0,0 – 5,6)			3,4 (0,0 – 27,9)			128,0 (3,5 – 955,1)			2343
Palma	Palmas aparentemente sanas									
	Externo			Interno			Raíz			-
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	-
Sana1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,4	0,0	0,0	-
Sana2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-
Sana3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,4	0,0	0,0	-

[±] Se reporta el promedio para cada tipo de tejido y entre paréntesis el rango encontrado

no, a pesar de que al momento del muestreo todas las palmas presentaban la enfermedad en uno u otro grado de avance. Los promedios estuvieron en 2,3 y 3,4 mg/kg para el tejido externo y de avance, respectivamente, variando la concentración entre cero y 27,9 mg/kg. No obstante, todas las muestras de raíz de las palmas enfermas presentaron ergosterol y además el promedio de su concentración fue muy superior (128 mg/kg) comparado con el promedio con la zona externa y de avance, confirmando la hipótesis de que la principal ruta de infección es a través del contacto de las raíces con inóculo presente en el suelo (Rees *et al.*, 2009).

La primera observación interesante fue al comparar las concentraciones de ergosterol de las palmas enfermas con las palmas sanas en los diferentes tejidos. Todas las palmas enfermas presentaron ergosterol y en muchos casos en altas concentraciones (Tabla 1), mientras que en las palmas sanas tomadas en el Campo Experimental El Palmar de La Vizcaína, ninguna muestra de la zona externa o interna del estípite presentó ergosterol y solo 2 réplicas de las 9 de la raíz lo hicieron en concentraciones de 11,4 y 13,4 mg/kg, esto debido a la presencia de microorganismos de micorrización o etapas iniciales de PBE. Las diferencias encontradas en presencia y concentración de ergosterol entre palmas enfermas y sanas, especialmente en las raíces, demuestran la capacidad que puede tener el ergosterol como marcador en la detección temprana de la PBE (Figura 3).

La segunda observación interesante fue la variación del contenido de ergosterol en las muestras de raíces de las palmas enfermas

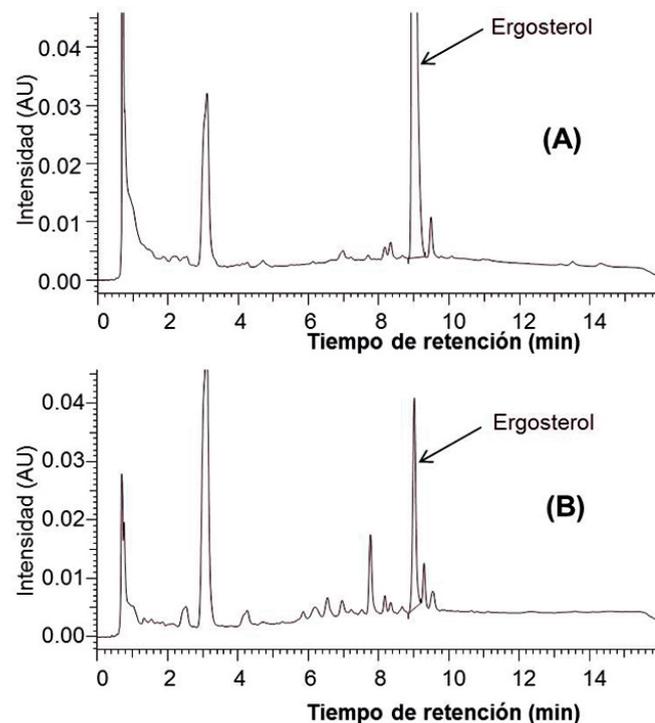


Figura 3. Perfiles cromatográficos del análisis de ergosterol por HPLC de una muestra de esporóforo (A) y una muestra de tejido de raíz de una palma enferma (B).

● (3,5 – 955,1 mg/kg). A primera vista, parece una variación alta y la hipótesis inicial era que las réplicas dieran valores similares entre palmas, sin embargo, los resultados mostraron lo contrario. No obstante, las réplicas de las muestras de raíces no se tomaron en un mismo punto del suelo sino de manera equidistante alrededor del tronco de la palma enferma. Los resultados muestran que las palmas 2, 3, 11 y 12 presentaron valores bajos y además similares de ergosterol en las réplicas de las muestras de raíz. Mientras que las ocho palmas restantes, es decir, las palmas 1, 4, 5, 7 y 10 presentaron una de las réplicas con mayor contenido de ergosterol que las demás y las palmas 6, 8 y 9 presentaron 2 o 3 de las réplicas con alto valor de ergosterol. Resultados parecidos se observaron en estudios previos con palmas comerciales del norte de Sumatra (Rees *et al.*, 2009) afectadas con la PBE. Los niveles altos de ergosterol en uno de los costados de la palma, indicando la alta presencia de agente infeccioso, sugiere que esta parte de las raíces posiblemente haya sido usada por el patógeno para ingresar a la palma (Rees *et al.*, 2009) o al mismo tiempo, esté usando las raíces para infectar a la palma vecina como lo mencionan Mestizo *et al.*, (2012). Estos resultados demuestran que por este método es posible detectar el avance de la enfermedad incluso antes de que la palma muestre síntomas foliares o en el tronco y prevenir su diseminación de igual forma como lo reportó Mohd *et al.* (2011), quienes encontraron una alta relación entre la cantidad de ergosterol y el grado de afección de la PBE en plántulas de vivero. Por supuesto, se deben desarrollar estudios posteriores dirigidos a evaluar el comportamiento del avance de la enfermedad entre palmas y dentro de la palma, además de refinar los métodos de muestreo y la técnica de diagnóstico frente a posibles interferencias con otros microorganismos presentes en el suelo.

Agradecimientos

Al personal y directivos de las plantaciones Palmeras de la Costa, Macaraquilla y El Roble (Guayabos) por permitirnos tomar las muestras. A los colegas Franky Zúñiga Pérez, Edwin Navia por la colaboración en la logística y toma de muestras y a Lisette Becerra por el apoyo en laboratorio. A Fedepalma-Fondo de Fomento Palmero (FFP) por la financiación de este proyecto.

Bibliografía

Arango, M., Martínez, G. 2013. *La tomografía: Una de las herramientas para el diagnóstico de la Pudrición basal del estípote de la palma de aceite*. XI Reunión Técnica Nacional de Palma de Aceite, 24-26 sep, Bogotá, D.C., Colombia.

Cooman, A., Lara, J. C., Tovar, J. P., Becerra, J. F., Quintero J. L. 2013. *Panorama fitosanitario nacional y retos en el manejo sanitario de la palma de aceite*. XI Reunión Técnica Nacional de Palma de Aceite, 24-26 sep, Bogotá, D.C., Colombia.

Dong, Y., Steffenson, B. J., Mirocha, C. J. 2006. Analysis of ergosterol in single kernel and ground grain by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (12): 4121-4125.

Mazliham, M. S. U., Loonis, P., Idris, A. S. 2008. *Interpretation of Sound Tomography Image for the Recognition of Ganoderma Infection Level in Oil Palm*. In Trends in Intelligent Systems and Computer Engineering (pp. 409-426). Springer, US.

Mestizo, Y. A., Bandera, G., Aya, H., Sarria, G., Varón, F., Navia, M., Martínez, G. 2012. Caracterización de síntomas e identificación de microorganismos en palmas de aceite afectadas por la Pudrición basal de estípote. *Palmas*, 33 (2): 13-26.

Mohd As'wad, A. W., Sariah, M., Paterson, R. R. M., Zainal Abidin, M. A., Lima, N. 2011. Ergosterol analyses of oil palm seedlings and plants infected with *Ganoderma*. *Crop Prot.*, 30 (11): 1438-1442.

Navia, M., Prada, F., Romero, M. 2012. *Development of diagnostic methods for detection of basal stem rot disease in oil palm in Colombia*, In: 10th Conference of the European Foundation for plant Pathology, October 1-5, Wageningen, the Netherlands.

Nieto P., Luis E. 1995. Incidencia de pudriciones de estipe de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Colombia. *Palmas*, 16: 227-232.

Pulido, D., Mestizo, Y., Bandera, G. C., Aya, H., Sarria, G., Varón, F., Martínez, G. 2011. *La pudrición basal del estípote en la palma de aceite en Indupalma Ltda.* X Reunión Técnica Nacional de Palma de Aceite, 21-23 sep, Bogotá, D.C., Colombia.

Rees, R. W., Flood, J., Hasan, Y., Potter, U., Cooper, R. M. 2009. Basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis*); mode of root infection and lower stem invasion by *Ganoderma boninense*. *Plant Pathol.*, 58 (5): 982-989.

Singh, G. 1991. *Ganoderma, the scourge of oil palms [Elaeis guineensis] in the coastal areas [Peninsular Malaysia]*. *Planter*, 67: 421-444.

Singh, G. 1993. *Ganoderma: seria enfermedad de la palma de aceite en las zonas costeras*. *Palmas*, 14 (3): 15-26.

Utomo, C., Niepold, F. 2000. Development of Diagnostic Methods for Detecting *Ganoderma*-infected Oil Palms. *J. Phytopathol.*, 148 (9-10): 507-514.

Yuan, J. P., Wang, J. H., Liu, X., Kuang, H. C., Huang, X. N. 2006. Determination of ergosterol in *Ganoderma* spore lipid from the germinating spores of *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (17): 6172-6176.



Director: José Ignacio Sanz Scovino, Ph.D.
Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma
Coordinación editorial: Yolanda Moreno Muñoz
Diseño y diagramación: ACE – Alianza en Comunicación Empresarial Ltda.
Impresión: Javegraf

Esta publicación contó con el apoyo de Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero