

# 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

## Greicy Sarria Villa

Investigadora asociada en el Programa de Plagas y Enfermedades en el Área de Fitopatología, de Cenipalma  
gsarria@cenipalma.org

## Gerardo Martínez

Líder Programa de Plagas y Enfermedades de Cenipalma

## Francia Varón

Asesora Grupo de Fitopatología de Cenipalma

## André Drenth

Asesor Universidad de Queensland, Australia

## David Guest

Asesor Universidad de Sídney, Australia

Durante la XI Reunión Técnica Nacional de Palma de Aceite

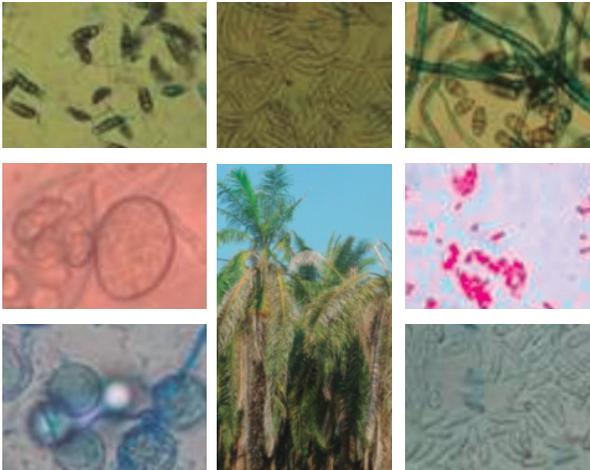
Septiembre 24 de 2013



## Introducción

No cabe duda de que la Pudrición del cogollo (PC) es la principal enfermedad del cultivo de la palma de aceite en Colombia. Más de 30.000 ha afectadas en Tumaco, más de 35.000 ha afectadas en la Zona Central y en los Llanos Orientales se han registrado subzonas de 54.000 ha con incidencias de más del 50 % de la enfermedad.

Para tratar la enfermedad de la Pudrición del cogollo (PC) hay que conocerla, empezar por saber contra quién se lucha y, de esta forma, establecer medidas de manejo. En esta presentación voy a mencionarles lo que se ha hecho en Cenipalma desde 2007. Se realizó un trabajo fuerte de aislamiento de microorganismos a partir de tejidos afectados por la PC, en torno a este problema aparecieron diferentes microorganismos: *Curvularia*, *Pestalotia*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, una variedad de bacterias, varios tipos de *Colletotrichum*, *Phythium* y *Phytophthora*, incluso algunos investigadores habían propuesto a *Phytophthora*, pero la dejaron a un lado (Figura 1).



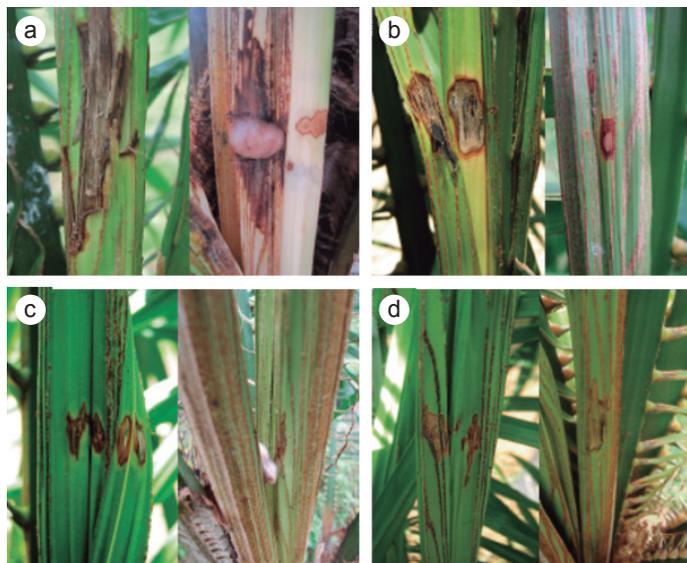
**Figura 1.** Algunos microorganismos aislados de plantas afectadas con la Pudrición del cogollo (PC).



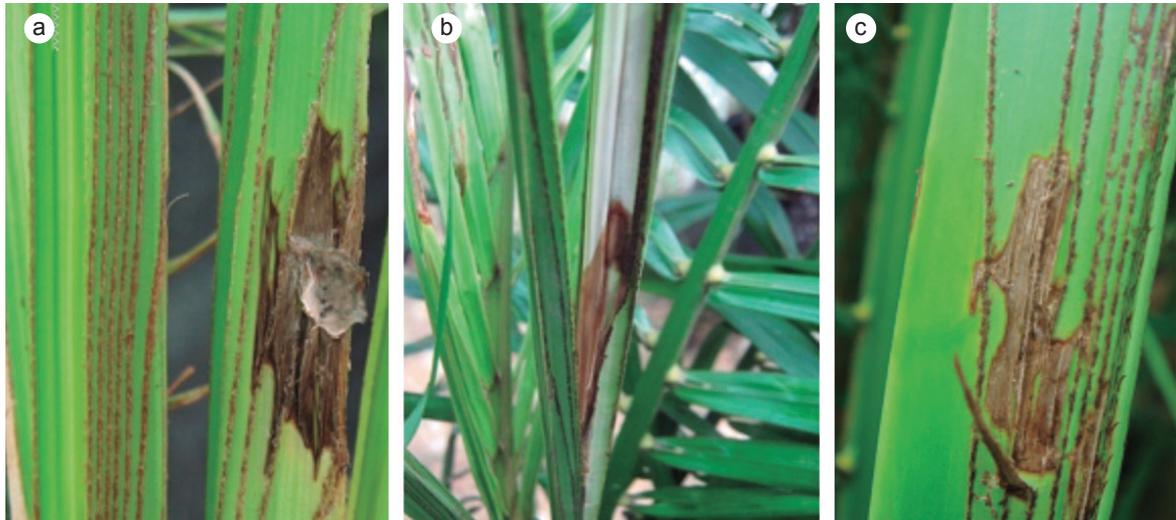
**Figura 2.** La Pudrición del cogollo (PC) en palma de aceite adulta.

En las investigaciones realizadas por Cenipalma desde ese año, el primer paso fue tomar todos los microorganismos obtenidos en el proceso de aislamiento de plantas afectadas por la PC en diferentes estados de daño, inocularlos en plantas de vivero y compararlos con lo que realmente se estaba observando en el campo; donde es muy frecuente que los palmicultores no crean que se trata de la Pudrición del cogollo hasta ver el cogollo completamente degradado o la flecha podrida (Figura 2); entonces, es probable que la enfermedad no se esté detectando a tiempo o haciendo una correcta identificación de los síntomas; a continuación, un recorrido por este proceso:

En la Figura 3, se observan inoculaciones iniciales con *Thielaviopsis*, *Colletotrichum* y *Fusarium*, que no se parecían en nada a las lesiones iniciales que se encontraban en campo, pero al inocular a *Phytophthora*, se veía que había un avance acuoso y cómo esas lesiones de *Phytophthora* no necesitaban ser inoculadas con alguna herida, era un microorganismo capaz de infectar, de pasar su infección entre los folíolos sin necesidad de que se le enterrara un palillo o se le hiciera una herida para causar infección y, además, podía extenderse entre los folíolos inmaduros de la palma de aceite (Figura 4).

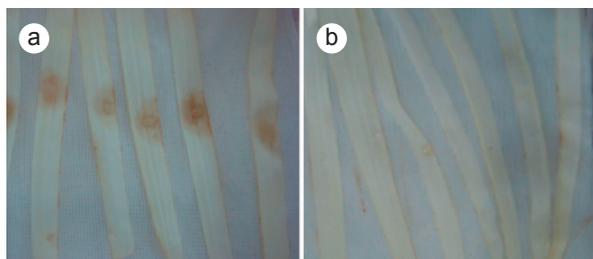


**Figura 3.** Inoculación de algunos de los microorganismos aislados de plantas afectadas por la PC. a. *Phytophthora palmivora*. b. *Thielaviopsis* sp. c. *Fusarium*. d. *Colletotrichum* sp.



**Figura 4.** Inoculación de *Phytophthora palmivora* en palmas de vivero.

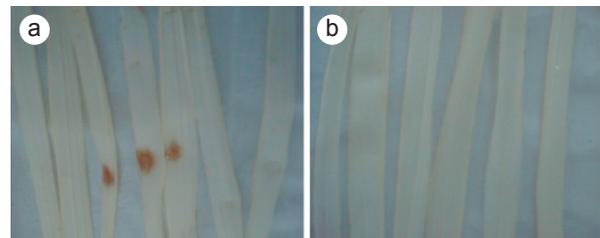
Se había avanzado en determinar de qué microorganismo se trataba, se sabía que *Phytophthora palmivora* estaba ahí en los tejidos de la palma de aceite y que era el agente causal, pero era necesario seguir investigando para conocer sobre su proceso infectivo y si en realidad podría afectar diferentes tejidos de la palma; entonces, se inició un proceso de inoculaciones durante varios años y de pruebas de patogenicidad en los tejidos más internos del cogollo. En estos tejidos se observó la reproducción de lesiones acuosas, pardas y similares a las que estaban en el cogollo de palmas en campo (Figura 5).



**Figura 5.** Lesiones en folíolos inmaduros de *E. guineensis* causadas por inoculaciones de *P. palmivora*.

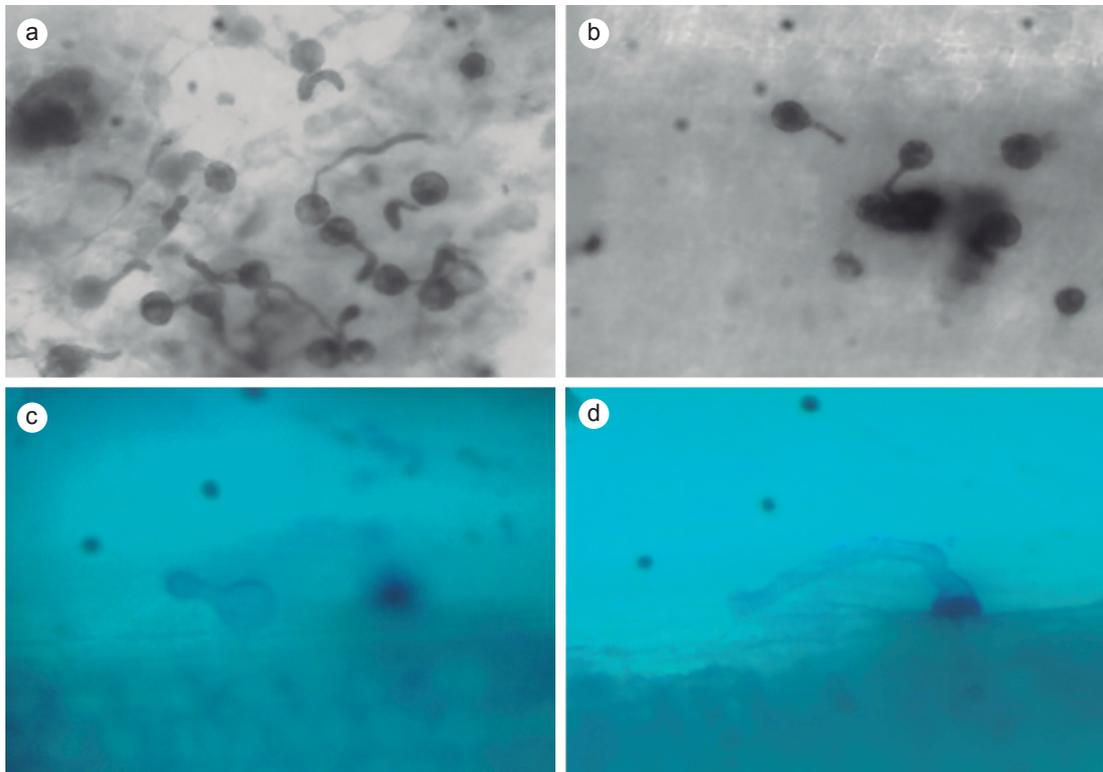
El híbrido OxG, por su parte, también fue inoculado y la respuesta fue completamente diferente, las lesiones no eran iguales en tamaño e incidencia a las de *E. guineensis*, mientras los

controles seguían sanos. Este comportamiento *in vitro* de tejidos del híbrido corroboraba lo que se observa con este material en condiciones de campo (Figura 6).



**Figura 6.** Lesiones en folíolos inmaduros de híbrido OxG causadas por inoculaciones de *P. palmivora*. a. lesiones acuosas b. Control

Además de ver que con el microorganismo se estaban reproduciendo los mismos síntomas en tejidos de la parte interna del cogollo, también se investigaba qué estaba pasando con el patógeno, entonces se podían observar las zoosporas de *P. palmivora* que son estructuras infectivas, cómo enquistaban y germinaban sobre el tejido. De igual manera se logró observar claramente que cuando *P. palmivora* está en el tejido de *E. guineensis* se detectan muchas zoosporas germinadas porque el patógeno está infectando agresivamente, mientras que en el híbrido OxG, hay pocas zoosporas de *P. palmivora* (Figura 7).



**Figura 7.** Desarrollo de *P. palmivora* en folíolos inmaduros de palma de aceite. a. Zoosporas germinando en *E. guineensis*. b. Zoosporas germinando en híbrido OxG. c. y d. Germinación y penetración de zoosporas en tejido del híbrido OxG.

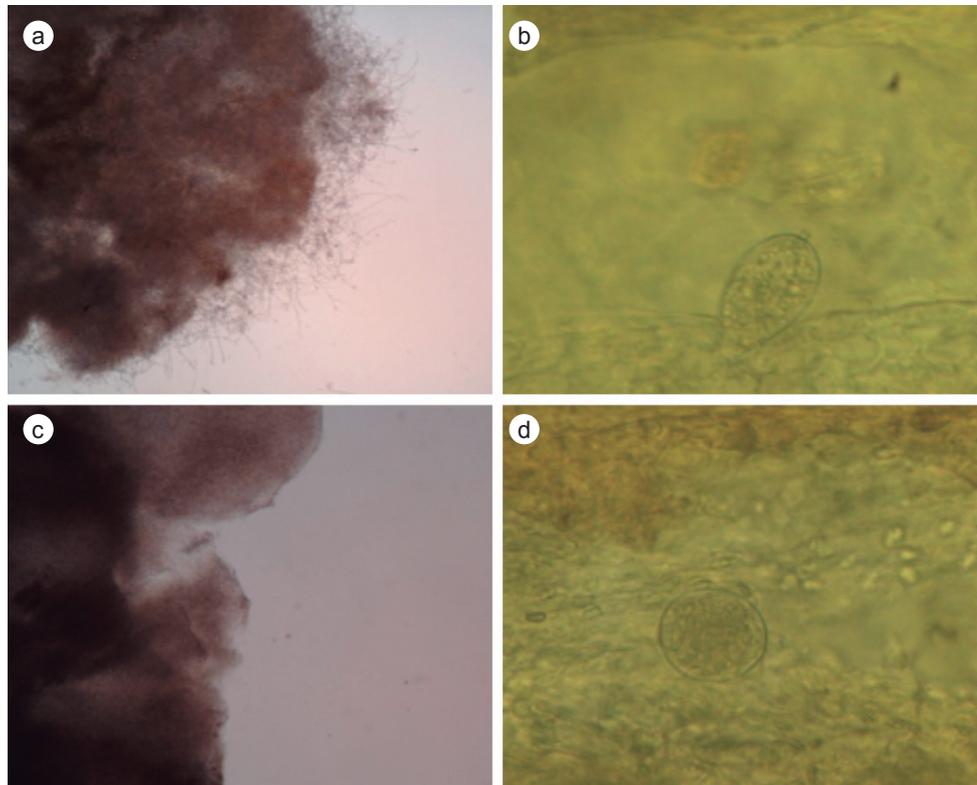
*Phytophthora* es un microorganismo que se mueve químicamente y las zoosporas no encuentran su mejor hospedero en el híbrido, este comportamiento también se presenta en campo; en el microscopio, se puede observar que la zoospora hace un esfuerzo por traspasar el punto de penetración, se aprecia muy bien la fuerza que el patógeno hace para penetrar el híbrido OxG, algo que no sucede en *E. guineensis* (Figura 7c y d).

Después de las primeras inoculaciones en folíolos, se hicieron inoculaciones en callos *in vitro* (Figura 8), pues sí se lograba ver que había un proceso infectivo en callos, se ganaba tiempo para que los mejoradores pudieran empezar a estudiar el comportamiento de los materiales en condiciones muy controladas y cerradas, para lo cual se tomaron los clones producidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Cenipalma y se inocularon con *P. palmivora*.

Se observó que 48 horas después ya se estaba multiplicando el microorganismo dentro de esos callos, o sea, que el tejido estaba siendo infectado por el patógeno (Figura 9).



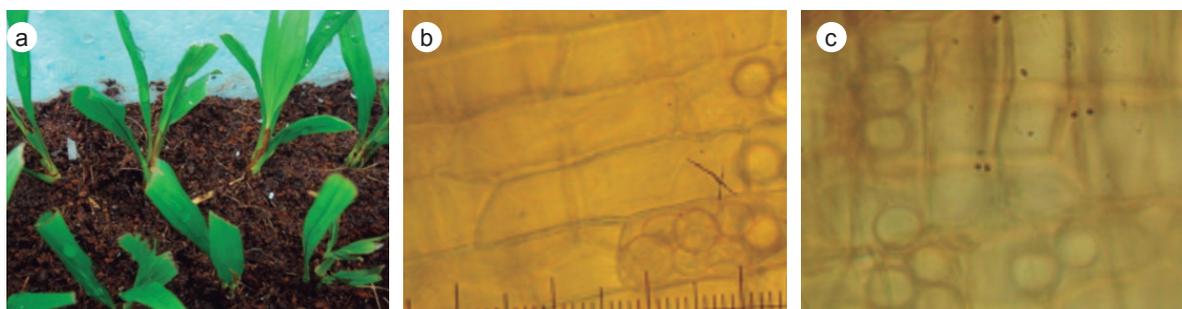
**Figura 7.** Inoculación *in vitro* de *P. palmivora* en callos de palma de aceite.



**Figura 9.** Desarrollo de *P. palmivora* en callos de palma de aceite en cultivo *in vitro*. a. Crecimiento del patógeno. b. Esporangio de *P. palmivora*. c. Control. d. Clamidospora.

Luego, se continuaron las pruebas de patogenicidad con plantas producidas en el Laboratorio de cultivos de tejidos de Cenipalma y se inocularon para ver qué pasaba (Figura 10), siete días después ya había una respuesta del patógeno y lesiones que descendían hacia la base de las hojas más jóvenes y al ob-

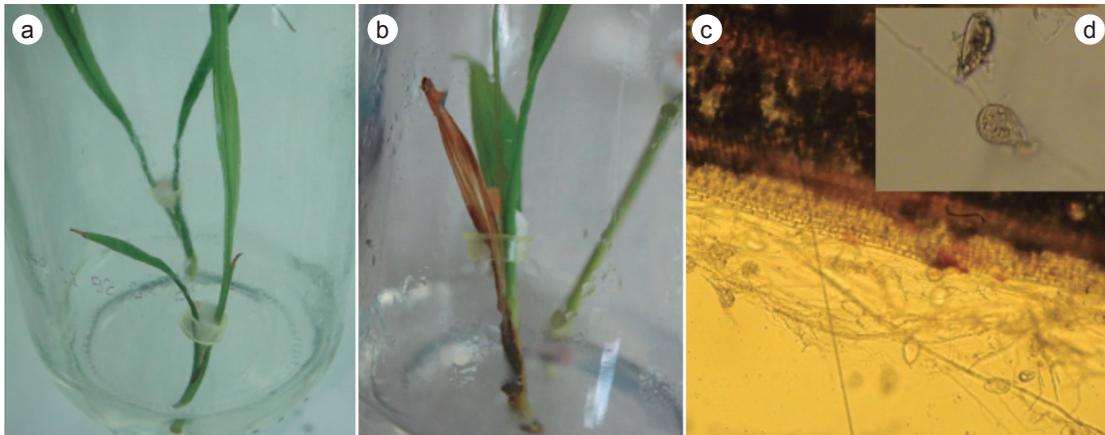
servar esos tejidos al microscopio encontramos estructuras del patógeno, es decir que, *P. palmivora* también estaba infectando esas plantas de clones que comparadas con el testigo se veía que, a pesar de que tenía unas lesiones, los tejidos estaban completamente libres del patógeno.



**Figura 10.** Lesiones de *P. palmivora* en plantas de cultivo de tejidos de palma de aceite. a. Necrosis avanzando hacia la base. b. y c. Estructuras del patógeno observadas en el tejido necrosado.

Estas inoculaciones se repitieron en clones *in vitro*, para esto se colocó el patógeno en las hojas jóvenes de igual manera como en los casos anteriores. Se depositaron 30 microlitros de una suspensión de zoosporas de 30.000 zoosporas/ml. Ocho días después de la inoculación se observaron lesiones iniciales, quince días más tarde ya habían hojas completamente degradadas y al interior de este tejido se encontraba una

gran colonización de *Phytophthora palmivora* y, además, se veía cómo el patógeno lograba replicarse y liberar esporangios (Figura 11), lo que mostraba, que en condiciones controladas de un clon *in vitro* de palma de aceite lográbamos replicar la enfermedad, el patógeno era capaz de penetrar esos tejidos, replicarse y, aun así, seguir produciendo inóculo en el tiempo, lo que ayuda a entender lo que pasa en campo.



**Figura 11.** Inoculación de *P. palmivora* en clones *in vitro* de *E. guineensis*. a. Plantas control. b. Síntomas de necrosis en tejido foliar observados en plantas inoculadas. c. Desarrollo del microorganismo en el tejido necrosado. d. Liberación de zoosporas a partir de esporangios producidos en el tejido afectado.

Con todos estos resultados de la patogenicidad de *Phytophthora palmivora*, se buscó conocer cómo es el mecanismo de desarrollo de la Pudrición del cogollo. Para esto lo principal fue entender que el proceso de infección de *P. palmivora* en palma de aceite es diferente a los procesos infectivos de cultivos semestrales, no estamos ante una enfermedad que se pueda replicar en seis meses, y no estamos ante un patógeno que se comporte igual que en otros cultivos. Para entender lo que pasa en la palma y cómo un microorganismo tan pequeño es capaz de dañar el cogollo de la palma, hay que empezar por romper el paradigma de que la PC solo es un cogollo podrido.

Un tejido que está degradado y colapsado ya no es un síntoma inicial de la PC, hay que entender que una enfermedad tan grave empieza por algo muy pequeño, que si las con-

diciones ambientales se dan, no se detecta a tiempo y no se actúa, tiene la capacidad de infectar algunos folíolos y, si las condiciones son favorables, la flecha sigue su proceso de desarrollo normal y ese tejido que antes estaba necrosado se desprende y quede un mordisco (Figura 7). Si el patógeno tiene todas las condiciones para desarrollarse, la lesión va a seguir avanzando entre los folíolos y a afectar enormemente la flecha, tanto que va a lograr colapsarla y podrirla; al retirar las hojas, se evidencia que la enfermedad estaba avanzando hacia adentro, muy cerca del meristemo. Para poder encontrar el agente causante de la PC, tuvimos que apartarnos de todos esos tejidos degradados y concentrarnos solo en la zona de avance de la enfermedad, donde el daño es casi imperceptible, es ahí donde es posible obtener a *P. palmivora*.



Para continuar entendiendo lo que pasa con este patógeno en palma de aceite, se tomaron clones *E. guineensis* para evitar la variabilidad, los inoculamos sin causar heridas y con las hojas jóvenes se hizo un cono con parafilm, le colocó un mililitro de zoosporas de *P. palmivora* de una suspensión de 60.000 zoosporas/ml, se hizo una cámara húmeda

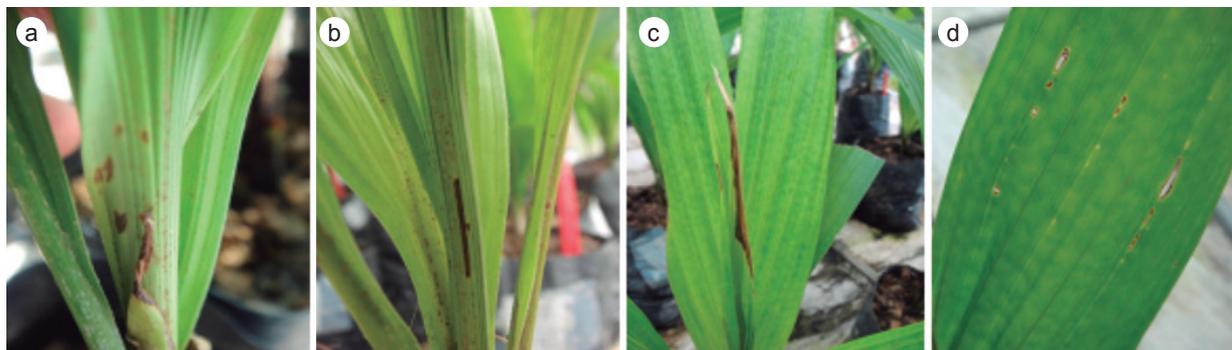
durante las primeras seis horas después de la inoculación y durante todo el ensayo se mantuvieron condiciones de alta humedad relativa similares a las que están en las plantaciones, 80 % o más cuando se presentan epidemias. Se inocularon 35 plantas y otras 35 fueron dejadas como controles a las cuales se les colocó solamente agua.



**Figura 12.** Inoculación de *P. palmivora* en clones *in vitro* de *E. guineensis*. a. Esporangio con zoosporas al interior. b. Inoculación de 1 ml de suspensión de zoosporas con una concentración de 60.000 zoosporas/ml. c. Condiciones de cámara húmeda durante las primeras seis horas después de la inoculación.

Siete días después de la inoculación habían lesiones muy pequeñas casi imperceptibles, esta hoja siguió su proceso de desarrollo normal, pero las que venían saliendo en esa planta, detrás de la primera hoja, presentaban lesiones cada vez más grandes; si las condiciones idea-

les se daban podían avanzar, de lo contrario, la hoja continuaba su proceso de desarrollo normal, abría, se ubicaban las lesiones probablemente en el ápice o en el centro y el tejido se desprendía y era muy posible que todos dijeran que ahí no había PC (Figura 13).



**Figura 13.** Lesiones necróticas en plantas inoculadas con *P. palmivora*. a. Lesiones necróticas pequeñas en tejidos jóvenes. b. Lesión necrótica evidente. c. Necrosis en el ápice de la hoja más joven. d. En el proceso de crecimiento normal de la hoja las lesiones se expanden, el tejido necrótico se desprende y quedan unos orificios aparentemente sin una causa conocida.

En el caso de condiciones desfavorables para el desarrollo del patógeno, la hoja abría, tenía mordiscos, el tejido se desprendía y aparentemente no había PC porque la hoja había abierto, entonces no había enfermedad (Figura 14), pero eso no era cierto, continuando con las observaciones de las plantas para ver qué pasaba con el inóculo inicial; se encontró que en esas hojas nuevas que vienen saliendo, una tras otra, el inó-

culo se mantenía y venían nuevas lesiones atrás; en el tiempo, cada flecha que iba saliendo venía con un mayor número de lesiones y mayor severidad (Figura 15); debido, probablemente, a que ese comportamiento de infecciones sucesivas permitía que ese inóculo inicial fuera cada vez mayor. De igual manera, fue posible observar un efecto de reducción del crecimiento en las plantas inoculadas comparadas con los controles.



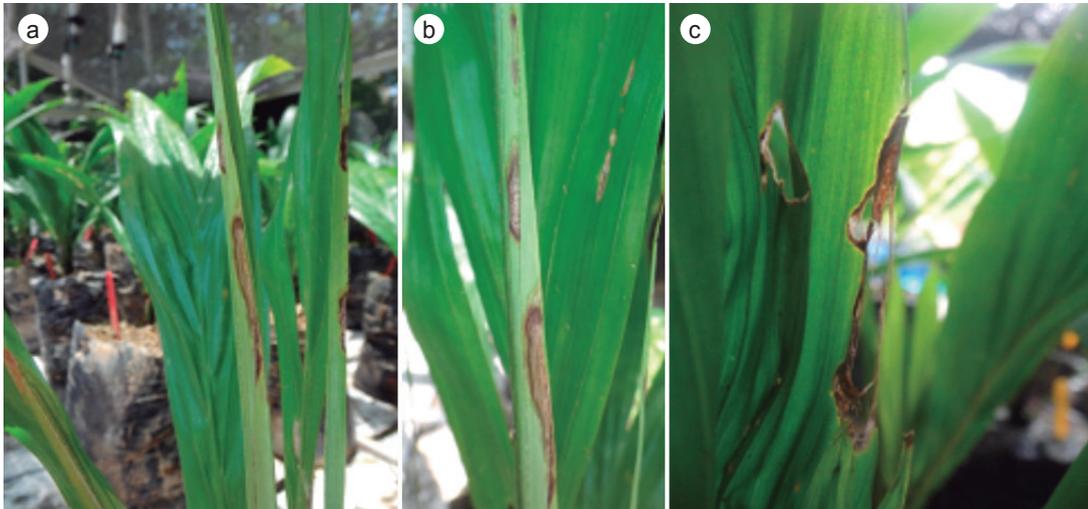
**Figura 14.** Desarrollo de lesiones en plantas inoculadas con *P. palmivora*. a. Síntomas similares a mordiscos. b., c., y d. Lesiones necróticas en el medio, ápice y borde de las hojas, las cuales en el proceso de crecimiento normal de la hoja se expanden, el tejido necrótico se desprende y quedan unos orificios aparentemente sin causa conocida.



**Figura 15.** Desarrollo de lesiones en plantas inoculadas con *P. palmivora*. Lesiones necróticas en flecha las cuales, a través del tiempo, expresaron mayor severidad, como producto del proceso de infecciones sucesivas.

A medida que pasaba el tiempo fue posible observar cómo las lesiones aparecían en los tejidos cada vez más jóvenes. Aproximadamente 110 días después de la inoculación se observaron lesiones que afectaban gran parte de la flecha, muy similares a las observadas en infecciones naturales. Esta flecha que presentó gran parte de tejido necrosado, abrió, las lesiones se ubicaron en los bordes y se des-

prendieron (Figura 16), Este comportamiento de infecciones sucesivas en las flechas de ese cogollo, en el cual habíamos depositado un inóculo inicial, nos permitía observar síntomas de la enfermedad en cada ciclo con una mayor severidad, también se logró ver necrosis en los foliolos rudimentarios de las palmas, que es uno de los síntomas que han sido asociados a la PC (Figura 17).



**Figura 16.** Desarrollo de lesiones en plantas inoculadas con *P. palmivora*. a. Lesiones necróticas en flecha. b. Detalle de lesiones necróticas con borde acuso típicas de la PC. c. Proceso de desarrollo y apertura normal de la flecha de las fotos a y b, donde se observa las lesiones necróticas ubicadas en el ápice o borde de la hoja.



**Figura 17.** Desarrollo de lesiones en plantas inoculadas con *P. palmivora*. a-e. Lesiones necróticas en flecha las cuales, a través del tiempo, expresaron mayor severidad, como producto del proceso de infecciones sucesivas. f. Necrosis en foliolos rudimentarios.

Catorce meses después de la inoculación con *Phytophthora palmivora*, aún se observaba este proceso de infecciones secundarias en las flechas, pero en este momento se tenía el 60 % de afección en la flecha (Figura 18). A pesar del grado de severidad, esta flecha también continuó con su proceso de desarrollo y abrió, las lesiones necróticas se desprendieron y aparentemente no pasaba nada. Sin embargo, se observó que la flecha que venía o la siguiente hoja más joven,

presentaba una lesión pequeña y acuosa (Figura 18b), al abrir esta flecha para verificar qué estaba pasando, se encontró que la lesión estaba avanzando al interior de esa flecha y se observaron los típicos mordiscos de la enfermedad en nuestras pruebas de patogenicidad (Figura 18c), esto estaba corroborando una vez más que estamos ante una enfermedad que presenta un proceso infectivo en el tiempo, *P. palmivora* es capaz de tener infecciones sucesivas en palma de aceite.

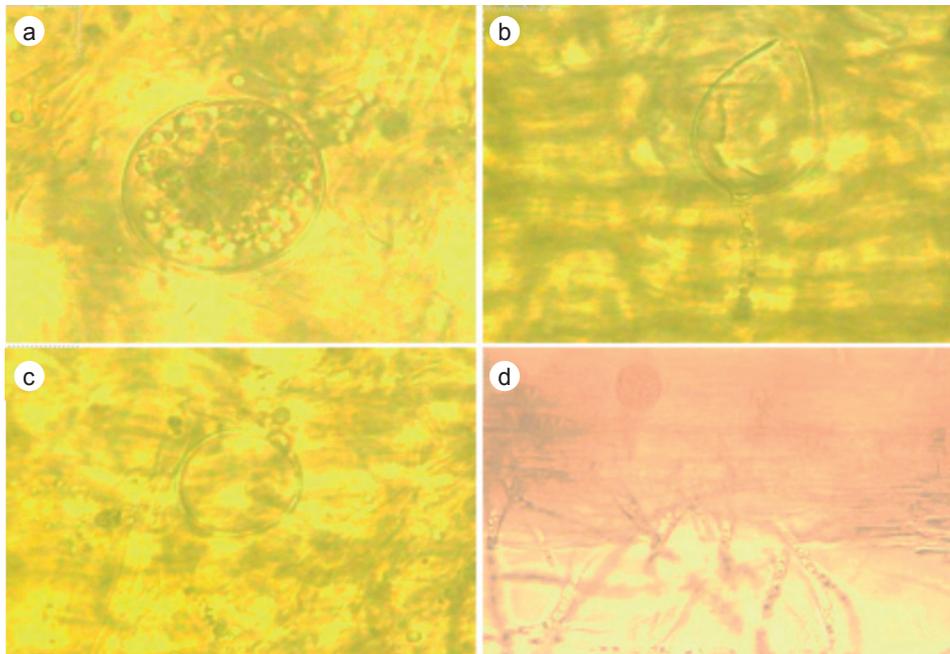


**Figura 18.** Desarrollo de lesiones en plantas inoculadas con *P. palmivora*. a. Lesiones necróticas afectando más del 60 % de la flecha. b. Lesiones pequeñas acuosas. c. Avance interno de las lesiones pequeñas y acuosas mostradas en la foto b.

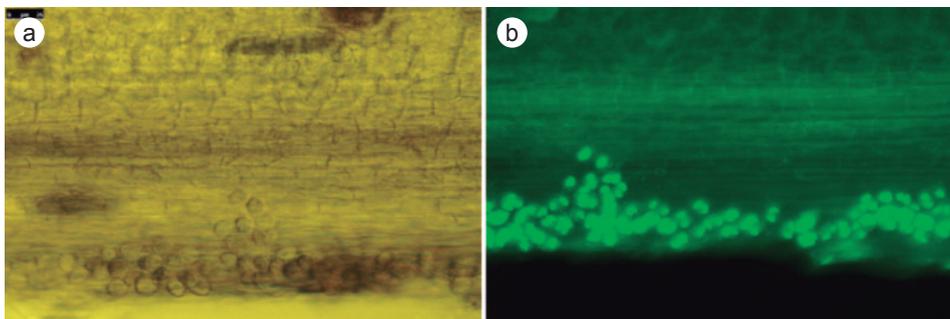
Entonces, lo que se hizo para corroborar esto fue tomar tejido de esos mordiscos y de la zona de avance acuosa donde no había necrosis, se llevó al laboratorio y se encontraron esporangios, clamidosporas, micelio de *P. palmivora* desarrollándose en estos tejidos (Figura 19), después de catorce meses de una primera inoculación estaba el patógeno ahí. Los esporangios fueron observados con microscopía de fluorescencia teñidos con DAPI, (técnica que tiñe de azul los núcleos que están viables); (Figura 20). Se observó gran cantidad de estructuras en el tejido, estos núcleos están teñidos porque están viables, son estructuras

de resistencia que le van a permitir al patógeno seguir en su proceso infectivo, entonces en donde aparentemente había una lesión muy pequeña, hay cantidades de estructuras del patógeno que van a ser capaces de seguir replicando esta enfermedad.

Adicionalmente, se tomaron estos tejidos de la zona de avance de la lesión, se colocaron en trampas con frutos de pera, cuando se observaron lesiones se tomó tejido de los bordes de la lesión y se aisló el microorganismo. Es decir, tenemos nuevamente a *P. palmivora*, por lo que hemos hecho un recorrido completo de los Postulados de Koch.



**Figura 19.** Estructuras de *Phytophthora palmivora* presentes en tejidos de plantas inoculadas con este patógeno. a. y c. Clamidosporas. b. Esporangios. d. Micelio.



**Figura 20.** Estructuras de *Phytophthora palmivora* presentes en tejidos de plantas inoculadas con este patógeno. a. Clamidosporas observadas al microscopio de luz. b. Clamidosporas observadas al microscopio de fluorescencia con técnica de DAPI.

En conclusión, no nos cabe duda que estamos ante el microorganismo del agente causante de la PC, un microorganismo capaz de causar la enfermedad, sostenerse en el tiempo dentro de una planta enferma si las condiciones y los palmeros se lo permiten. Se debe prevenir con una detección temprana. Y, finalmente, la presencia de signos del patógeno en las lesiones observadas confirma que *Phytophthora palmi-*

*vora* es el responsable de ellas, como siempre, esto se corrobora en todas nuestras pruebas.

### Agradecimientos

Este trabajo fue desarrollado por el grupo de Fitopatología, bajo la dirección de Gerardo Martínez, Líder del Programa de Plagas y Enfermedades de Cenipalma.