

# Pudrición del cogollo: avances, retos y oportunidades en el manejo integrado de esta enfermedad

Bud Rot: Advances, Challenges and Opportunities for an Integrated Control of the Disease

**PALABRAS CLAVE:** palma de aceite, *Phytophthora palmivora*, infección, fuentes de inóculo.

## GREICY ANDREA SARRIA VILLA

Investigadora Asociada. Programa de Plagas y Enfermedades, Cenipalma  
gsarria@cenipalma.org

## YURI ADRIANA MESTIZO

Programa de Plagas y Enfermedades, Cenipalma

## WILLIAM FABIÁN BETANCOURT

Programa de Plagas y Enfermedades, Cenipalma

## ALEJANDRA MILENA GARCÍA

Programa de Plagas y Enfermedades, Cenipalma

## FRANCIA VARÓN

Programa de Plagas y Enfermedades, Cenipalma

## JULIÁN FERNANDO BECERRA ENCINALES

Coordinador Nacional de Manejo Sanitario, Cenipalma

## Resumen

La Pudrición del cogollo continúa siendo uno de los principales problemas de la palmicultura colombiana. Desde el hallazgo del agente causal *Phytophthora palmivora* en 2008 (Martínez *et al.*, 2008), Cenipalma ha seguido avanzando en la investigación de esta enfermedad, siendo una de las principales metas llegar a conocer cómo se desarrolla y sobrevive. Para ello, el primer paso fue estudiar el proceso de infección, en donde se pudo determinar el tiempo de infección, los sitios de penetración y la colonización

en tejidos del cogollo, es decir, dónde y cómo se lleva a cabo el proceso infectivo. Las investigaciones en torno a la enfermedad permitieron descubrir que desde la primera media hora las zoosporas nadan hacia sitios específicos, que son los tricomas, en donde se enquistan e inician el proceso de infección, el cual se completa en un periodo de 26-48 horas. Se encontró además que *P. palmivora* tiene como sitio de entrada principal los tricomas, a diferencia de la mayoría de patógenos, los cuales ingresan a través de los estomas, lo que explica la alta especificidad entre el patógeno y la planta. Así mismo, se concluyó que la colonización interna se da en principio de manera intercelular y

posteriormente de modo intracelular. Por otra parte, se han identificado las principales fuentes de inóculo de *P. palmivora*, con la evaluación del patógeno en muestras de agua, suelos y flechas afectadas por la PC, mediante observaciones directas y trampeos. Los resultados en este frente evidencian la presencia del patógeno en suelo, tejidos y fuentes de agua, lo cual indica que estos constituyen una fuente de inóculo para la enfermedad. Finalmente, conscientes de que *P. palmivora* es un habitante natural del suelo, se ha iniciado la búsqueda de posibles reguladores biológicos como alternativa preventiva para su manejo, logrando avances importantes en la obtención de cepas nativas en palma de aceite y antagónicas de *P. palmivora* que están siendo evaluadas en condiciones de campo. Así mismo, se continuará con la búsqueda de nuevas alternativas biológicas, químicas y culturales para el manejo de la Pudrición del cogollo.

## Introducción

Desde los primeros registros de la PC en Colombia, en la plantación Coldsas en Turbo (Antioquia), donde fueron destruidas más de 2.000 hectáreas (De Rojas & Ruiz, 1972), la enfermedad se ha ido expandiendo a las diferentes zonas palmeras y ha alcanzado características epidémicas, siendo la responsable de la afectación de más de 75.000 ha en las zonas Suroccidental y Central durante la última década (Martínez *et al.*, 2013). Después de la identificación de los estados tempranos de la PC y la escala de severidad (Martínez *et al.*, 2007), se identificó a *Phytophthora palmivora* como el agente causante de la Pudrición del cogollo (Martínez *et al.*, 2008; Sarria *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2010). Con este paso importante se continuó explorando posibles alternativas para el control de la enfermedad, lo cual permitió desarrollar un paquete de manejo integrado de la PC (Martínez *et al.* 2009; Morales *et al.*, 2010; Aya & Martínez, 2011), cuya estrategia, además de la detección temprana y la intervención oportuna de palmas enfermas, incluía la adopción de buenas prácticas agronómicas (selección del material de siembra libre de PC, preparación de suelo, construcción de dre-

najes necesarios, programa de nutrición, establecimiento de arvenses, monitoreo y control de plagas y enfermedades) desde las etapas de planeación, establecimiento y desarrollo del cultivo, buscando mantener el equilibrio que las plantas requieren para responder a la enfermedad.

Posteriormente, se identificó el proceso de desarrollo de la PC en flechas debido a la aparición de pequeñas lesiones de color marrón, rodeadas de una zona acuosa, durante los estados iniciales de la enfermedad, las cuales se necrosan a medida que el tejido emerge. Cuando la flecha abre, como parte de su proceso normal de desarrollo, el tejido necrosado se desprende y cae, evidenciando huecos o mordiscos en las hojas, sin embargo, cuando las condiciones ambientales son favorables, este tejido afectado puede infectar los folíolos más cercanos, ocasionando nuevas infecciones. Estas infecciones secundarias se caracterizan por presentar mayor número de lesiones y mayor área afectada, logrando con el paso del tiempo afectar más del 80 % de la flecha. Lo anterior indica que la PC en estados avanzados es el resultado de un proceso cíclico en el tiempo, lo cual puede ser corroborado con el comportamiento de la enfermedad en el campo (Sarria *et al.*, 2013).

A partir de la información anterior, se hizo prioritario comenzar a trabajar en tres frentes de acción para avanzar en el conocimiento de la enfermedad y buscar el equilibrio natural de su agente causante en los cultivos de palma de aceite. El primer paso fue comprender cómo este microorganismo puede infectar los tejidos quizás más protegidos de la palma de aceite, como son los tejidos jóvenes o tejidos del cogollo. En segunda medida, entender parte del comportamiento epidémico que ha mostrado la enfermedad, mediante el conocimiento de la sobrevivencia y las fuentes que contribuyen al establecimiento de la PC. Finalmente, comprobar si *P. palmivora* es un habitante natural del suelo, buscando con ello identificar una alternativa que permitiera la regulación biológica del patógeno en su ambiente natural y que lograra contribuir sustancialmente con el desarrollo de las prácticas de manejo integrado, minimizando así el impacto de la PC en la palmicultura colombiana.

## Materiales y métodos

### Proceso de infección

Se recolectaron en campo tejidos del cogollo de plantas sanas de *E. guineensis* de 2,5 años de edad, los cuales fueron refrigerados y transportados al laboratorio de fitopatología de Cenipalma en el Campo Experimental Palmar de La Vizcaína. En condiciones de cámara de flujo laminar, los tejidos externos se eliminaron asépticamente para recoger folíolos inmaduros de 15 cm de longitud. Posteriormente, se colocaron individualmente en bandejas provistas de

papel toalla y tul previamente esterilizados. A continuación, dichos tejidos fueron inoculados con 20  $\mu$ l de una suspensión de zoosporas *P. palmivora* con una concentración de 20.000 ml zoosporas/mililitro. El inóculo fue depositado cuidadosamente sobre el haz de los folíolos sin causar herida alguna. En el caso de los controles se aplicaron 20  $\mu$ l de agua destilada esterilizada (Figura 1). En seguida, fueron mantenidos en condiciones de laboratorio para la evaluación de los síntomas, mediante la medición de la longitud de la lesión. Adicionalmente, se utilizaron tejidos para el seguimiento histológico del proceso de infección; para esto se realizaron cortes transversales de 30 – 50  $\mu$ m (Sarria *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Inoculación de folíolos inmaduros: **a.** Cogollo extraído de palma sana en campo con 2,5 años de edad; **b.** y **c.** Extracción de folíolos inmaduros; **d.** Separación de folíolos; **e.** Disposición de folíolos individuales en bandejas, provistas de papel toalla y malla, previamente esterilizadas; **f.** Inoculación con 20- $\mu$ L de una suspensión de 20.000 zoosporas de *P. palmivora*; **g.** Disposición final en bolsas plásticas para favorecer condiciones de alta humedad.

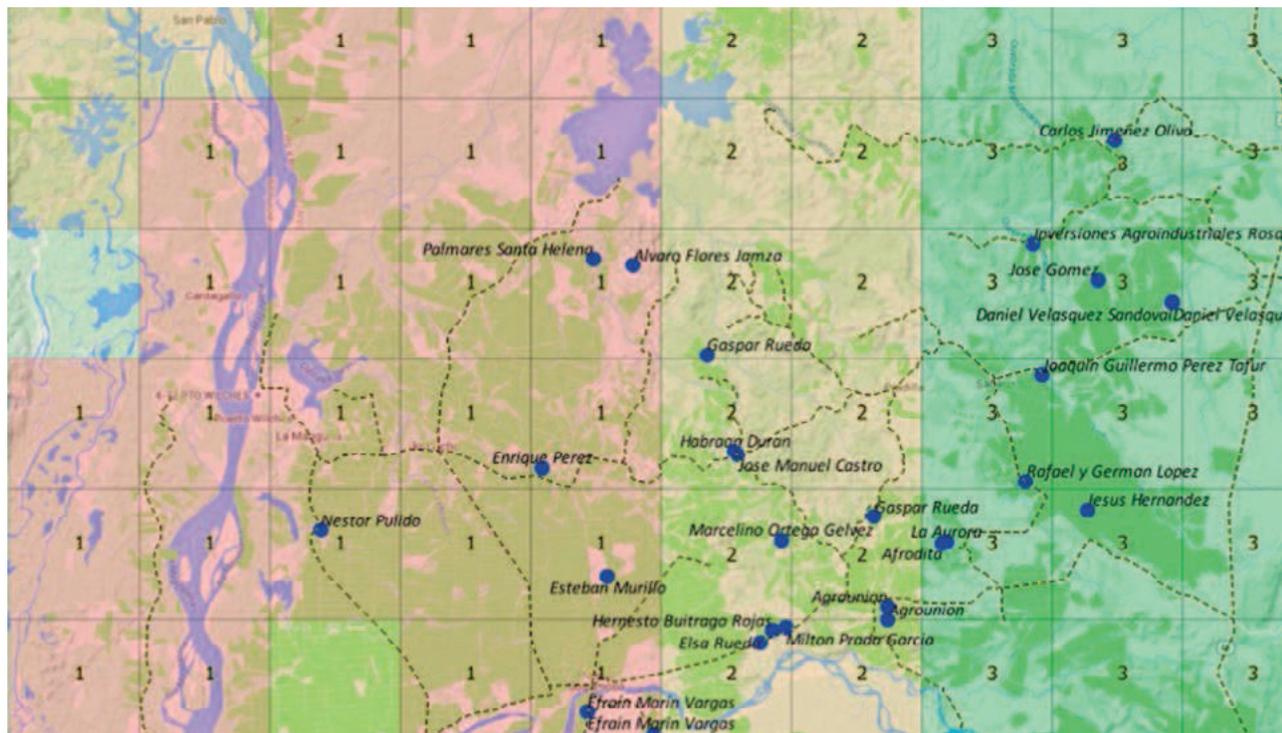
## Fuentes de inóculo y diseminación

Para la evaluación de fuentes de inóculo de *P. palmivora* en palma de aceite, se realizó un recorrido por las tres zonas delimitadas por el ICA en el marco del Convenio N° 387 de 2013: Área 1 o de explosión epidémica de PC, área 2 o de intervención de la PC y área 3 o zona de avance (Figura 2). En cada área se seleccionaron 10 plantaciones, para un total de 30 plantaciones ubicadas en los municipios de Barrancabermeja, Puerto Wilches y Sabana de Torres (Santander). Estas plantaciones fueron muestreadas mensualmente durante un periodo de nueve meses.

La toma de muestras consistió en coleccionar suelo de la zona de mayor concentración de raíces de palmas afectadas por la PC, tejidos afectados por la PC en estados avanzados presentes en palmas afectadas o en residuos depositados en el suelo y muestras de fuentes de agua o sitios con encharcamiento dentro de lotes con la enfermedad.

Teniendo en cuenta los antecedentes de la dificultad para la obtención del aislamiento *in vitro* de *P. palmivora* de palma de aceite, se planteó la evaluación de estructuras del patógeno presente en las muestras tomadas en campo mediante el uso de trampas con tejido del cogollo y frutos de pera, susceptibles a ser infectados por el microorganismo.

En el caso del suelo se tomaron muestras de tres puntos del área de mayor concentración de raíces, las cuales fueron homogenizadas para obtener aproximadamente 300 gramos por muestra. En condiciones de laboratorio, se utilizaron 30 g de suelo por muestra. Para el trampeo, se usaron vasos plásticos de nueve onzas desinfectados donde se colocó el suelo y se vertió agua destilada esterilizada llenando la mitad del recipiente (100 ml aprox.). Posteriormente, se colocaron los tejidos trampa en contacto con el agua. En total, por cada submuestra de suelo, se realizaron dos montajes de laboratorio que involucraron cuatro trampas por montaje, para un total de 40 evaluaciones por plantación. Pasadas 48-72 horas, se realizaron observaciones del tejido trampa con ayuda del



**Figura 2.** Zonas delimitadas por el ICA en el marco del Convenio N° 387 de 2013. El área 1 o de explosión epidémica de PC, área 2 o de intervención de la PC y área 3 o zona de avance de la enfermedad.

microscopio de luz para identificar las estructuras típicas de *Phytophthora* sp.

Las muestras de agua fueron colectadas en tubos *Falcom* estériles de 50 cc, colectando dos submuestras por plantación. En laboratorio, en condiciones de cámara de flujo laminar, se realizaron cuatro montajes con trampas de cada submuestra, las cuales fueron evaluadas por duplicado, dando un total de ocho observaciones por muestra. Estas trampas consistieron en colocar dentro de un recipiente esterilizado el agua y algunos frutos de pera o tejidos de cogollo previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 3 %. Dichas trampas fueron evaluadas con el fin de verificar el desarrollo de lesiones húmedas y de la esporulación típica del microorganismo. Una vez observado el crecimiento del patógeno, se procedió a realizar observaciones microscópicas, la identificación de estructuras y, en caso de ser posible, el aislamiento del mismo.

Las muestras de residuos de tejido afectado fueron secadas en el laboratorio, mediante el uso de un horno a 30 °C durante 2-3 días. Las muestras deshidratadas fueron trituradas y posteriormente analizadas, con la ayuda del microscopio de luz (Figura 3), para evaluar y cuantificar la presencia de estructuras en este tejido.

De igual manera, se evaluaron diferentes alternativas para que los palmicultores pudieran actuar frente a la presencia de estructuras de *P. palmivora* que pueden jugar un papel importante en el establecimiento y la diseminación de la PC en sus plantaciones.

### Búsqueda de alternativas biológicas

Para la búsqueda de alternativas biológicas de *P. palmivora*, se tomaron muestras de suelo de áreas no in-



**Figura 3.** Toma y procesamiento de muestras para evaluación de fuentes de inóculo: **a.** Tejidos necrosados afectados por la PC, los cuales son secados y almacenados en tubos hasta su correspondiente evaluación al microscopio; **b.** Agua de sitios encharcados, usada para trampeos con frutos de pera y tejidos de palma; **c.** Trampeo de muestras de suelo, usando el agua como vehículo y tejidos del cogollo de la palma de aceite como trampa.

tervenidas de plantaciones de palma de aceite de la Zona Central. Estas muestras fueron tomadas entre 10 y 15 centímetros de profundidad con un volumen aproximado de 300 gramos cada una, descartando la primera capa de materia orgánica. Luego, fueron procesadas en laboratorio, colocando 100 gramos de suelo homogenizado en un matraz de *Erlenmeyer* con 900 mililitros de agua destilada esterilizada que fue además agitada. A partir de esta agua, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^6$ , sembrando las últimas tres diluciones en medio de cultivo, papa dextrosa, agar PDA, Agar agua AA y agar nutriente AN. Una vez sembradas las diluciones en los medios de cultivo, se incubaron en condiciones de laboratorio hasta la observación del crecimiento de microorganismos fungosos y bacterianos. Posteriormente, se realizaron las réplicas necesarias hasta la obtención en cultivos puro.

Para la evaluación de la actividad biológica de los microorganismos obtenidos, se realizaron pruebas *in vitro*, midiendo la velocidad del crecimiento, la capacidad de inhibición, las interacciones micoparasíticas y las propiedades antibióticas contra el aislamiento de *P. palmivora* CPPhZOC-01 agente causante de la PC.

## Resultados

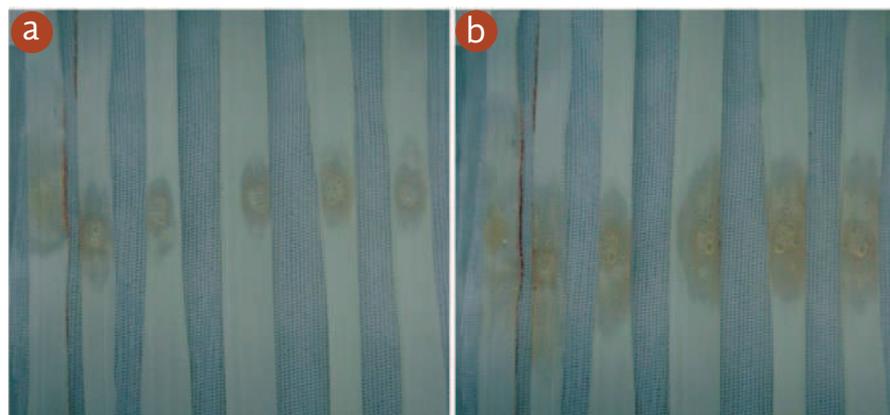
### Proceso de infección

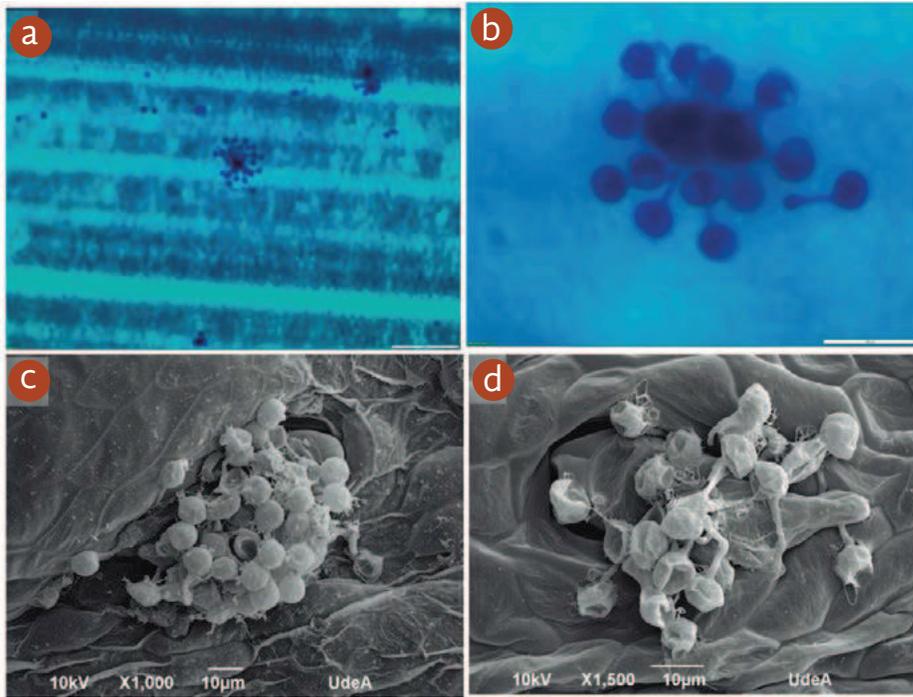
Después de 48 horas de la inoculación se observaron los primeros síntomas en los folíolos inoculados, los cuales presentaron lesiones acuosas, que 24 horas

más tarde mostraban coloración marrón de crecimiento irregular y con borde acuoso, similares a los síntomas observados en los tejidos más internos del cogollo de palmas afectadas con la PC en el campo (Figura 4). Estos síntomas no fueron observados en los controles. La degradación y lisis del tejido causada por el patógeno fue evidente, mostrando que *P. palmivora* puede colonizar rápidamente los folíolos inoculados. Este resultado fue corroborado por la presencia de estructuras del patógeno, tales como hifas, esporangios y clamidosporas, en las lesiones.

El proceso de infección estuvo acompañado inicialmente por el enquistamiento de las zoosporas y, posteriormente, por la germinación y la agrupación de las mismas en algunos sitios de los folíolos. Después de media hora de la inoculación de las zoosporas de *P. palmivora*, el 37 % estaban enquistadas y agrupadas en algunos sitios de los folíolos. Media hora más tarde, el porcentaje de zoosporas germinadas fue superior al 80 %. En este momento se observó que la gran mayoría había germinado en pequeños grupos (Figura 5a). Revisando en detalle los sitios donde se ubicaron los grupos de zoosporas germinadas, fue posible determinar que estas dirigieron sus tubos germinativos hacia el lugar donde se ubicaban los tricomas (Figura 5b y c). En secciones transversales de tejido con 60 micras de espesor, se observó que estos tubos germinativos efectivamente estaban dirigiéndose hacia los tricomas una hora después de la inoculación; adicionalmente, se observó cómo el tubo germinativo era capaz de penetrar los tejidos de la palma por los espacios intercelulares donde estaba el tricoma; en otros casos estos se adherían fuertemente a los tejidos del tricoma (Figura 5d).

**Figura 4.** Síntomas en folíolos inmaduros inoculados con *Phytophthora palmivora*: **a.** Lesiones acuosas 48 horas después de la inoculación (hdi); **b.** Lesiones acuosas tornándose de color marrón 72 hdi.

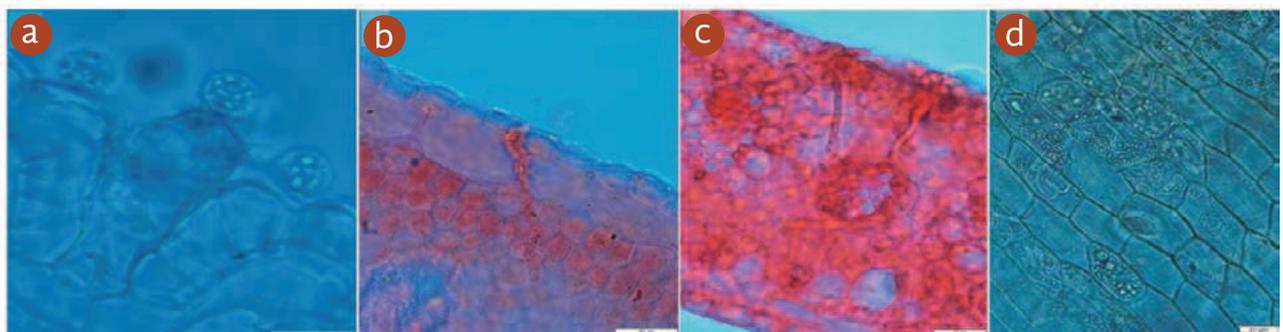




**Figura 5.** Enquistamiento y germinación de zoosporas de *Phytophthora palmivora* inoculadas en folíolos inmaduros de palma de aceite 1 hdi: **a.** zoosporas agrupadas en sitios específicos; **b., c. y d.** zoosporas germinadas y agrupadas en los tricomas.

Dos horas más tarde, algunos de los tubos germinativos habían iniciado el proceso de infección a través de células epidérmicas sin mostrar cambios en su grosor. Otros habían iniciado con un engrosamiento de la hifa que en algunos casos parecía ser una estructura similar a un apresorio, el cual podía estar ubicado sobre el tricoma o en las paredes laterales del mismo (Figura 6a); a través de este apresorio se observó el desarrollo de un tubo de penetración que fue avanzando a medida que transcurrió el tiempo (Sarria *et al.*, 2015).

Entre tres y cuatro horas luego de la inoculación esta hifa micelial había ingresado al tejido foliar abarcando gran parte del tricoma. De cuatro a seis horas después de la inoculación, en los cortes transversales del folíolo de 60 micras de espesor, se observó cómo después de la penetración la hifa avanzó, invadiendo los espacios intercelulares y luego pasando al interior de la célula. Continuando con su proceso de colonización se movió inter e intracelularmente a través de los tejidos hasta llegar a los haces vasculares (Figura 6 b, c y d).



**Figura 6.** Penetración y colonización de *Phytophthora palmivora* en folíolos inmaduros de palma de aceite: **a.** Penetración a través del tricoma; **b.** Colonización a través de espacios intercelulares; **c. y d.** Colonización inter e intracelularmente.

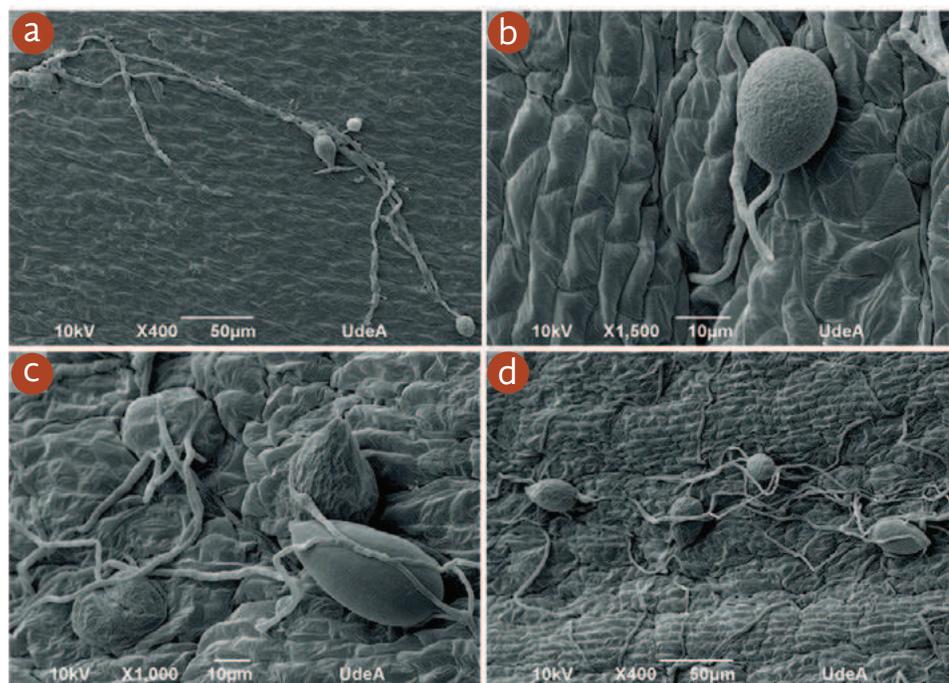
Luego de 12 horas desde de la inoculación, la colonización progresó tanto longitudinal como lateralmente, ramificándose en los tejidos del folíolo; 12 h más tarde (24 hdi), la hifa había colonizado gran parte del tejido e iniciado un proceso de expansión a la superficie del tejido, usando para esto los espacios celulares, los estomas y las hifas cavidades estomatales (Figura 7a). A partir de este crecimiento de la hifa entre 36 a 48 horas después de la inoculación, se observó el desarrollo de clamidosporas y esporangios (Figura 7b, c y d). En presencia de alta humedad y de agua estos esporangios liberaron nuevas zoosporas que dieron origen a infecciones secundarias del patógeno, contribuyendo de esta manera con su diseminación y el avance de la lesión (Sarria *et al.*, 2015).

### Fuentes de inóculo

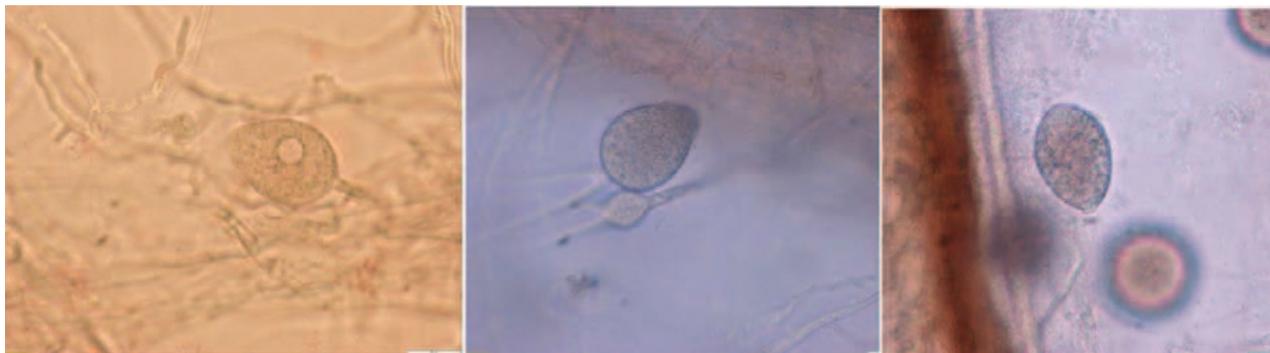
Mediante los trampeos *in situ* en fuentes de agua, se logró observar estructuras similares a las registradas para el género *Phytophthora*, aunque se presentaron

dificultades que no permitieron continuar con las evaluaciones. Sin embargo, la presencia de estructuras en las trampas de frutas (Figura 8a, b y c) indica que el desplazamiento del microorganismo causante de la Pudrición del cogollo (PC) mediante el cauce de fuentes hídricas como quebradas, cuyas partes altas inundan plantaciones problema y durante su curso el afluyente, puede llegar a convertirse en un posible diseminador del patógeno, iniciando infestaciones en áreas más bajas.

En los trampeos de muestras de agua de sitios con encharcamiento y de canales de drenaje de las plantaciones, se logró observar estructuras de *Phytophthora* (Figura 8). Aunque la proporción de muestras positivas con esporangios y clamidosporas de los muestreos realizadas en las tres zonas no superó el 30 % (Tabla 1), es importante tener en cuenta que la preferencia de este oomicetos por el agua, los mecanismos de movilidad con los que cuenta *P. palmivora* y los antecedentes de la dispersión de la enfermedad, indican que el patógeno puede usar el agua como un vehículo para dispersarse.



**Figura 7.** Colonización y emergencia de *Phytophthora palmivora* en folíolos inmaduros de palma de aceite: **a.** Desarrollo de la hifa sobre la superficie del tejido 24 hdi; **b.** Emergencia de la hifa a través de los espacios intercelulares; **c.** Emergencia de la hifa a través de los estomas; **d.** Emergencia hifal y formación de esporangios y clamidosporas entre 36 y 48 hdi.



**Figura 8.** Esporangios observados en trampeos de muestras de agua para evaluación de fuentes de inóculo de *P. palmivora* en palma de aceite.

**Tabla 1.** Proporción de estructuras de *Phytophthora* observadas en trampeos de muestras de agua.

Tipo de muestra	Área	% Clamidosporas	% Esporangios	% Estructuras similares a Oosporas
Agua	1	15	25	10
Agua	2	20	20	5
Agua	3	25	10	20

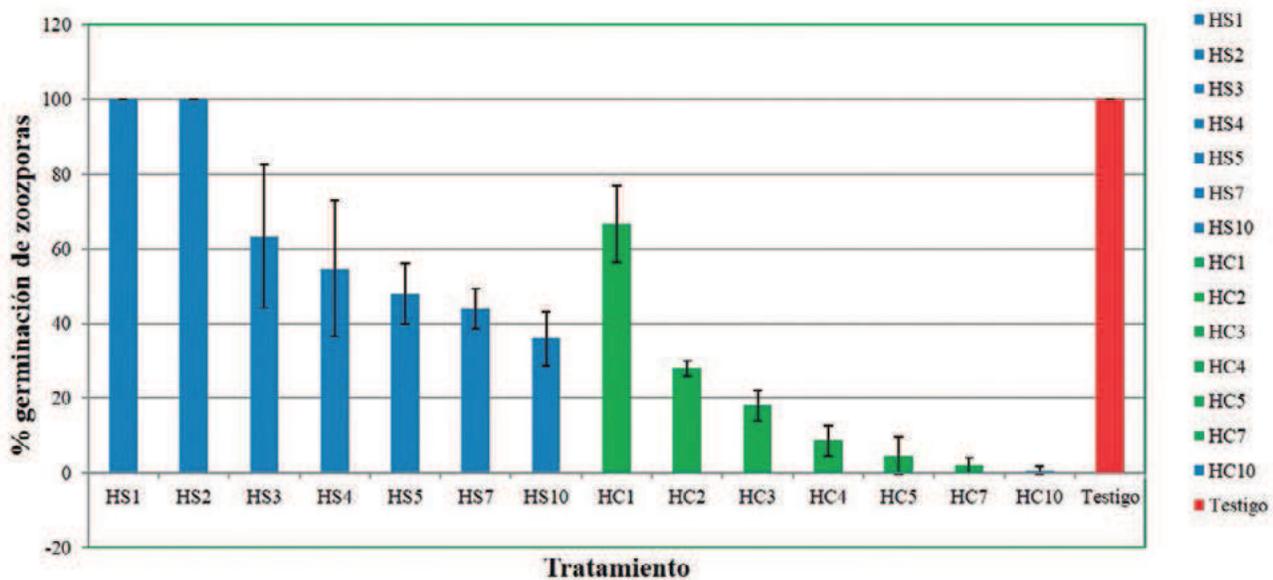
Lo anterior puede sustentarse teniendo en cuenta que las zoosporas de *Phytophthora* son producidas y liberadas únicamente en presencia de agua, y que estas son capaces de desplazarse por medio de sus flagelos aumentando el rango de dispersión y la capacidad de localizar nuevos hospederos. De esta manera, las zoosporas son consideradas como las principales estructuras encargadas de la dispersión del patógeno dentro de las especies de oomicetos (Ochaiai *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta la presencia de estructuras de *Phytophthora* en el agua y con el fin de brindar una alternativa viable para el tratamiento de agua de riego en viveros, se realizaron evaluaciones *in vitro* de la germinación de zoosporas de *P. palmivora* en agua tratada. Para esto se usaron hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio, de los cuales se usan dosis 1-5 mg/L para consumo humano. Para el caso del ensayo se evaluaron dosis de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 mg/L, mientras

que para el tratamiento control se usó agua destilada esterilizada.

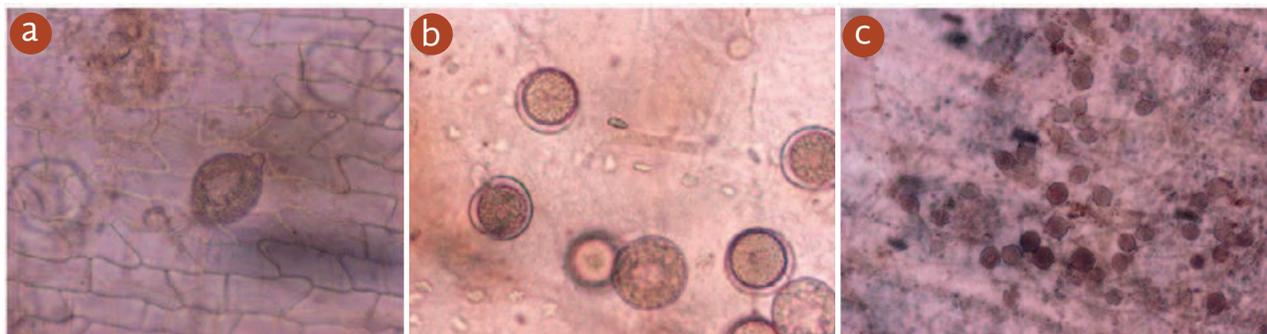
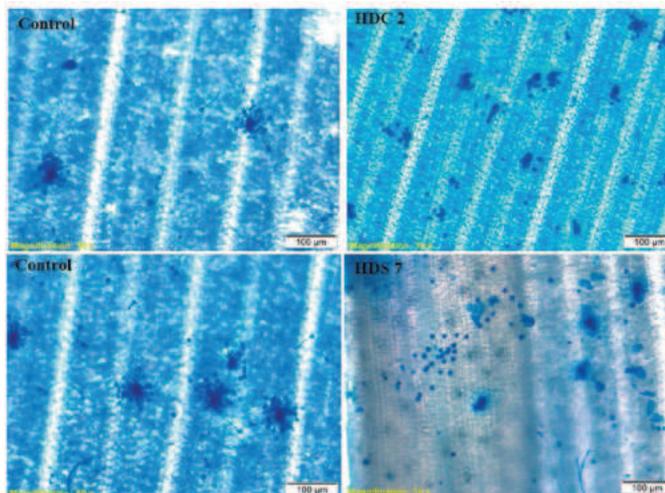
Se pudo observar que el tratamiento del agua con hipoclorito de calcio mostró reducción en el porcentaje de germinación de zoosporas de *P. palmivora* en todas las dosis evaluadas, comparadas con el testigo (Figura 9). En el caso del hipoclorito de sodio solo se observó reducción en la germinación de zoosporas de *P. palmivora* con las dosis de 3, 4, 5, 7 y 10 mg/L. Con estos resultados *in vitro* se tiene una alternativa viable que seguirá siendo evaluada en condiciones de campo (Figura 10).

Adicionalmente, fue posible encontrar estructuras de *P. palmivora* en muestras de suelo (Figura 11). De igual manera, se encontraron esporangios de otra especie de *Phytophthora* sp. De las dos especies se logró obtener el aislamiento puro en condiciones *in vitro*. Estos resultados confirman los registros en la literatura que indican que *P. palmivora* es un habi-



**Figura 9.** Porcentaje de germinación de zoosporas de *Phytophthora palmivora* en agua tratada con hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio.

**Figura 10.** Germinación de zoosporas en agua tratada con hipoclorito de calcio 2 $\mu$ L/L (HDC 2) e hipoclorito de sodio 7 $\mu$ L/L (HDS 7).



**Figura 11.** Estructuras de *Phytophthora* observadas desarrollándose en folíolos trampa de muestras de suelo: **a.** Esporangio; **b.** Clamidosporas; **c.** Esporangios y clamidosporas.

tante natural del suelo capaz de sobrevivir y moverse a través de espacios porosos.

Las estructuras de *Phytophthora* observadas en las áreas de muestreo de suelo fueron clamidosporas y esporangios; además de unas estructuras redondas con tres paredes similares a oosporas. Sin embargo, los estudios para la obtención del patógeno a partir de estas estructuras continuarán. Como era de esperarse, en las tres zonas se logró encontrar el patógeno en el suelo, su hábitat natural. Sin embargo, la presencia de estructuras de *Phytophthora* fue mayor en el área 1, donde no se realizó intervención en las palmas enfermas, mientras que en el área 2 fue menor debido a que se realizó la eliminación de palmas en estados avanzados, así como la remoción y el tratamiento de tejidos afectados (Tabla 2).

A pesar de que el área 3 también presenta estructuras del patógeno, los porcentajes son muy bajos, lo cual, muy probablemente, indica que el manejo oportuno de la enfermedad y la correcta eliminación de residuos contribuye a disminuir la presencia del patógeno en el suelo y, por ende, de la fuente de inóculo.

La agresividad que caracteriza a *Phytophthora* está asociada con la habilidad que tiene de producir

estructuras reproductivas como zoosporas y esporangios para su sobrevivencia a corto plazo y su diseminación; sus oosporas y clamidosporas le permiten sobrevivencia a largo plazo. Además, los esporangios pueden ser transportados por el viento y tienen la capacidad de albergar entre cuatro y 32 zoosporas en condiciones de humedad, las cuales pueden también causar múltiples infecciones (Drenth & Sendall, 2001; Drenth & Goodwin, 1999).

En la verificación de estructuras en residuos de tejidos afectados por la PC, fue posible encontrar estructuras de resistencia como clamidosporas, lo cual es algo que se esperaba debido a la capacidad que tienen los oomycetos para sobrevivir en condiciones adversas.

De las muestras de tejido el hallazgo importante radica en la presencia de los esporangios, teniendo en cuenta que este tipo de estructuras no sobreviven en condiciones adversas (Figura 12 y Tabla 3). Adicionalmente, se logró verificar su patogenicidad en tejidos sanos de palma de aceite y obtener aislamientos puros de *P. palmivora* a partir de estos esporangios (Figura 13).

Se encontraron las otras estructuras de forma redonda con tres capas, similares a oosporas de *Phytoph-*

**Tabla 2.** Estructuras de *Phytophthora* observadas en trampeos de muestras de suelo.

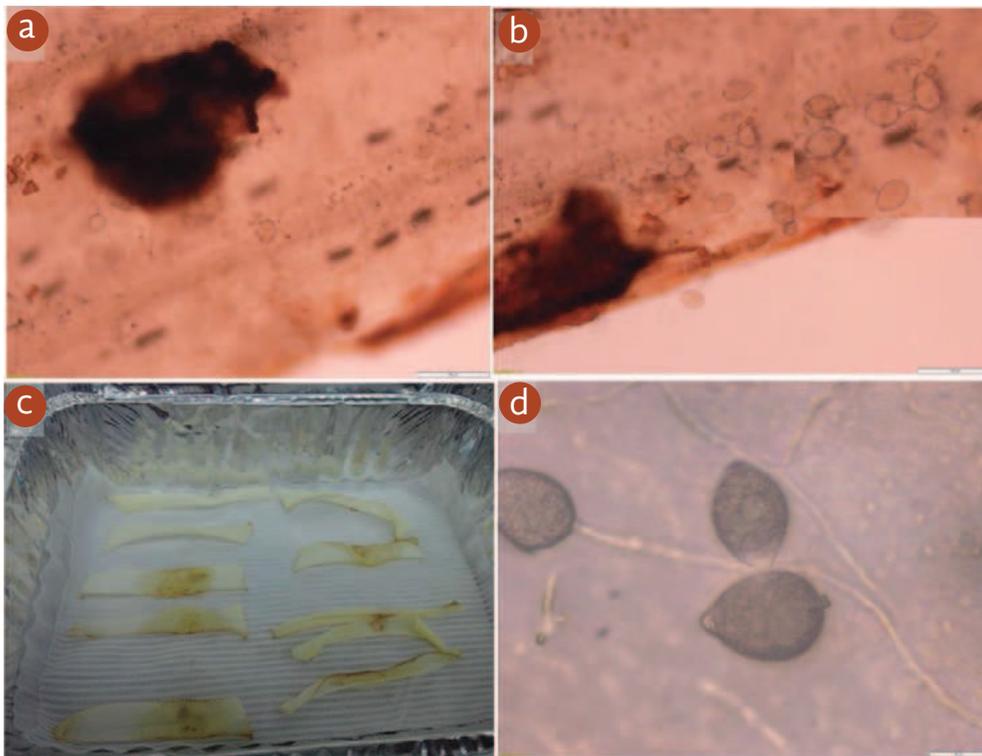
Tipo de muestra	Área	% Clamidosporas	% Esporangios	% Estructuras similares a Oosporas
Suelo	1	43	48	8
Suelo	2	20	9	1
Suelo	3	9	9	1



**Figura 12.** Estructuras observadas en residuos de tejidos afectados por la PC, para evaluación de fuentes de inóculo de *P. palmivora* en palma de aceite: **a.** Estructuras con tres paredes similares a Oosporas; **b. y c.** Esporangios de *P. palmivora*.

**Tabla 3.** Estructuras de *Phytophthora* observadas en residuos de tejidos afectados por la PC.

Tipo de muestra	Área	Promedio de Clamidosporas/100g materias seca (MS)	Promedio de Esporangios/100g MS	Promedio de estructuras similares a Oosporas/100g MS
Tejido	1	43	48	8
Tejido	2	20	9	1
Tejido	3	9	9	1



**Figura 13.** Patogenicidad de esporangios de *P. palmivora* procedentes de residuos de tejido necrosado e inoculados en tejidos sanos del cogollo de palma de aceite: **a. y b.** Desarrollo de esporangios sobre el tejido inoculado; **c.** Desarrollo de lesiones en tejidos sanos de palma de aceite; **d.** Esporangios de *P. palmivora* obtenidos en reaislamiento.

*thora*, las cuales se usarán para realizar aislamientos con el fin de verificar si a partir de ellas se puede obtener el microorganismo.

El aspecto relevante de las observaciones es que estas permiten confirmar la sobrevivencia del patógeno en tejidos afectados, aún en condiciones adver-

sas. Lo anterior, constituye una herramienta más en el conocimiento de la Pudrición del cogollo, con lo cual se pone de manifiesto la necesidad de realizar la eliminación correcta de los residuos de tejidos enfermos y/o residuos de cirugías, para así inactivar estas estructuras, disminuir su capacidad infectiva y, por

consiguiente, disminuir estructuras del patógeno que ayudan al establecimiento y dispersión de la enfermedad, es decir, la reducción de fuentes de inóculo.

Las clamidosporas y las posibles oosporas observadas en los tejidos necrosados afectados por la PC, son estructuras del patógeno que se esperaba encontrar durante los estudios, teniendo en cuenta que algunas especies pueden producir clamidosporas (asexual) a partir del micelio, como en el caso de *P. palmivora*, y oosporas durante la reproducción sexual.

La presencia de estructuras de *Phytophthora* fue mayor en el área 1 en comparación con el área de intervención o área 2 y en el área 3 o zona de avance. Aunque estos datos concuerdan con lo esperado, por no tener manejo en el área 1 la cantidad de esporangios encontrados es muy alta; muestra de la capacidad que tiene *Phytophthora* de sobrevivir en estos tejidos convirtiéndose en una fuente potencial de la enfermedad.

Teniendo en cuenta la presencia de estructuras de *P. palmivora* en residuos de tejido afectado, se realizó una evaluación en un lote en la zona de Puerto Wilches que fue encendido por accidente, comparado con un lote de la misma zona con antecedentes de PC y que no ha sido intervenido. Para esto, se tomaron muestras de suelo en 10 puntos al azar en cada uno de los lotes y se llevaron al laboratorio, en donde fueron procesadas individualmente mediante trampeos para *P. palmivora*. Como resultado de esta evaluación, en el lote donde no se había realizado intervención alguna, y aún así existían palmas afectadas por la PC, se encontró el patógeno en los 10 puntos analizados, e incluso palmas espontáneas con síntomas de PC que presentaron esporangios de *P. palmivora* en tejidos afectados. En contraste, las muestras de suelo tomadas del sitio que había sido quemado accidentalmente no presentaban estructuras del patógeno. No obstante, es importante mencionar que tres meses más tarde se realizó un segundo muestreo en los lotes quemados, encontrando que en las palmas en pie que habían rebrotado se evidenciaban estructuras *P. palmivora* en los tejidos nuevos del cogollo, mostrando así que ocasionar incendios sobre el suelo

o en palmas en pie no es una opción viable para el control de la PC.

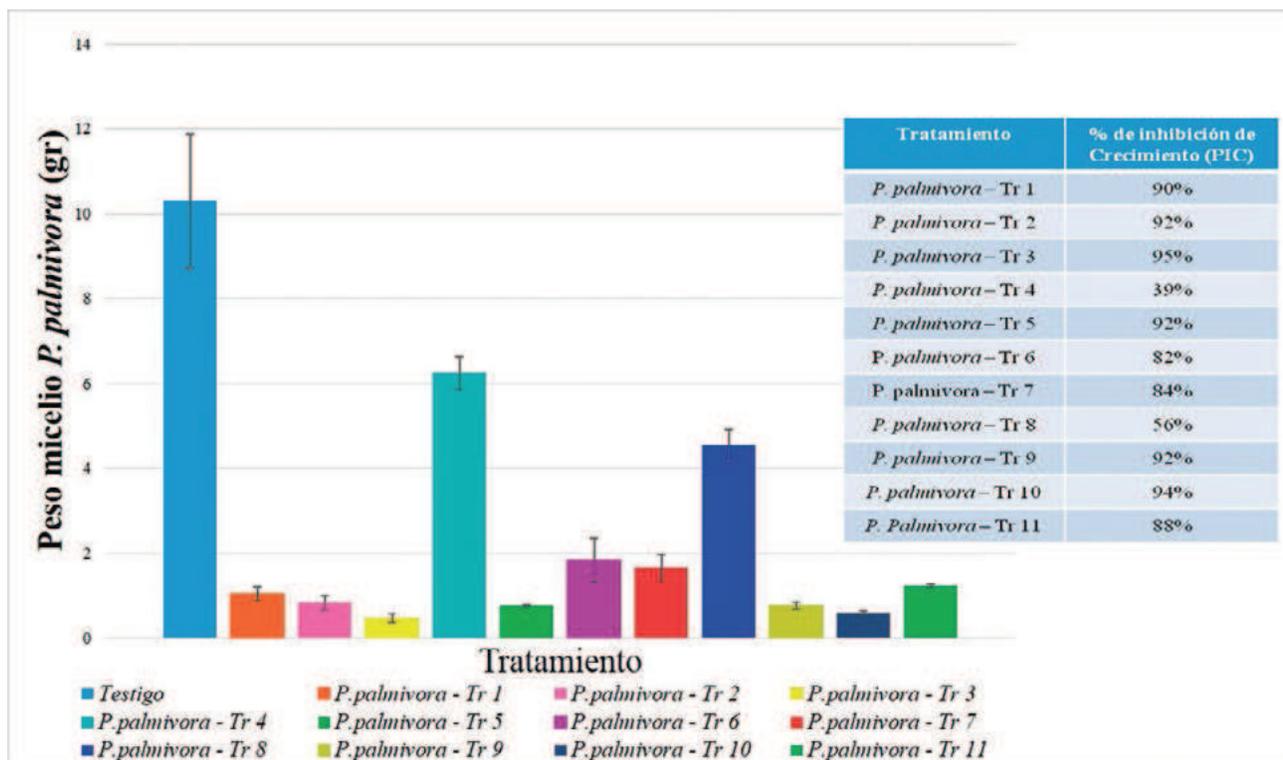
Por otra parte, en evaluaciones realizadas a residuos de tejidos afectados por la PC, producto de la remoción de tejidos de las cirugías, que habían sido sacados del lote en bolsas bien cerradas para ser carbonizados, no se encontraron estructuras de *P. palmivora* en el producto final.

## Búsqueda de alternativas biológicas

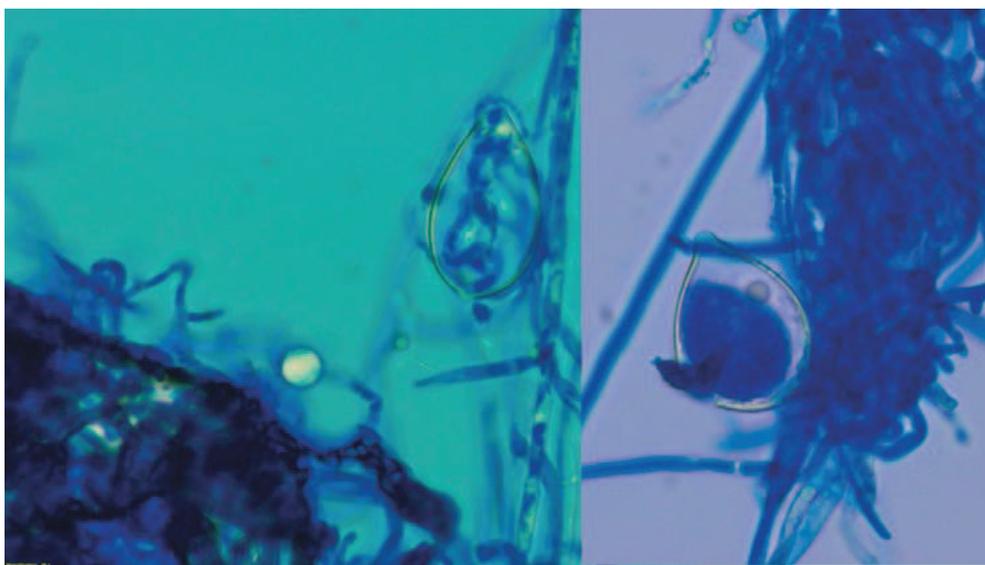
En laboratorio se evaluó el potencial biocontrolador de seis aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. Adicionalmente, fueron incluidos dos aislamientos donados por la profesora Liliana Hoyos de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín – y tres aislamientos comerciales. Los resultados indican que los aislamientos de *Trichoderma* tienen la capacidad *in vitro* de inhibir el desarrollo de *P. palmivora* en un 95 % por el efecto de metabolitos no volátiles (Figura 14).

Así mismo, a nivel *in vitro* se observó que algunos de los aislamientos de *Trichoderma* evaluados presentaban buena actividad micoparasítica sobre *P. palmivora*, agente causante de la Pudrición del cogollo, invadiendo internamente los esporangios y ocasionando enrollamiento y estrangulamiento de la hifa de *P. palmivora* (Figura 15).

A pesar de que estos estudios a nivel *in vitro* aún continúan, una de las cepas nativas obtenidas de la Plantación Pravia S.A., está siendo evaluada en condiciones de campo, logrando hasta la fecha una reducción en la presencia de estructuras en el suelo; lo cual se evidencia con la presencia de esporangios, clamidosporas y estructuras similares a oosporas, encontradas en el primer muestreo antes de la aplicación del biocontrol, comparadas con el muestreo realizado al tercero y quinto mes después de la aplicación. Sin embargo, resulta interesante que en residuos de tejidos enfermos que fueron eliminados y flameados inicialmente, cinco meses después en evaluaciones de laboratorio aún es posible encontrar estructuras del patógeno (Tabla 4 y Figura 16).



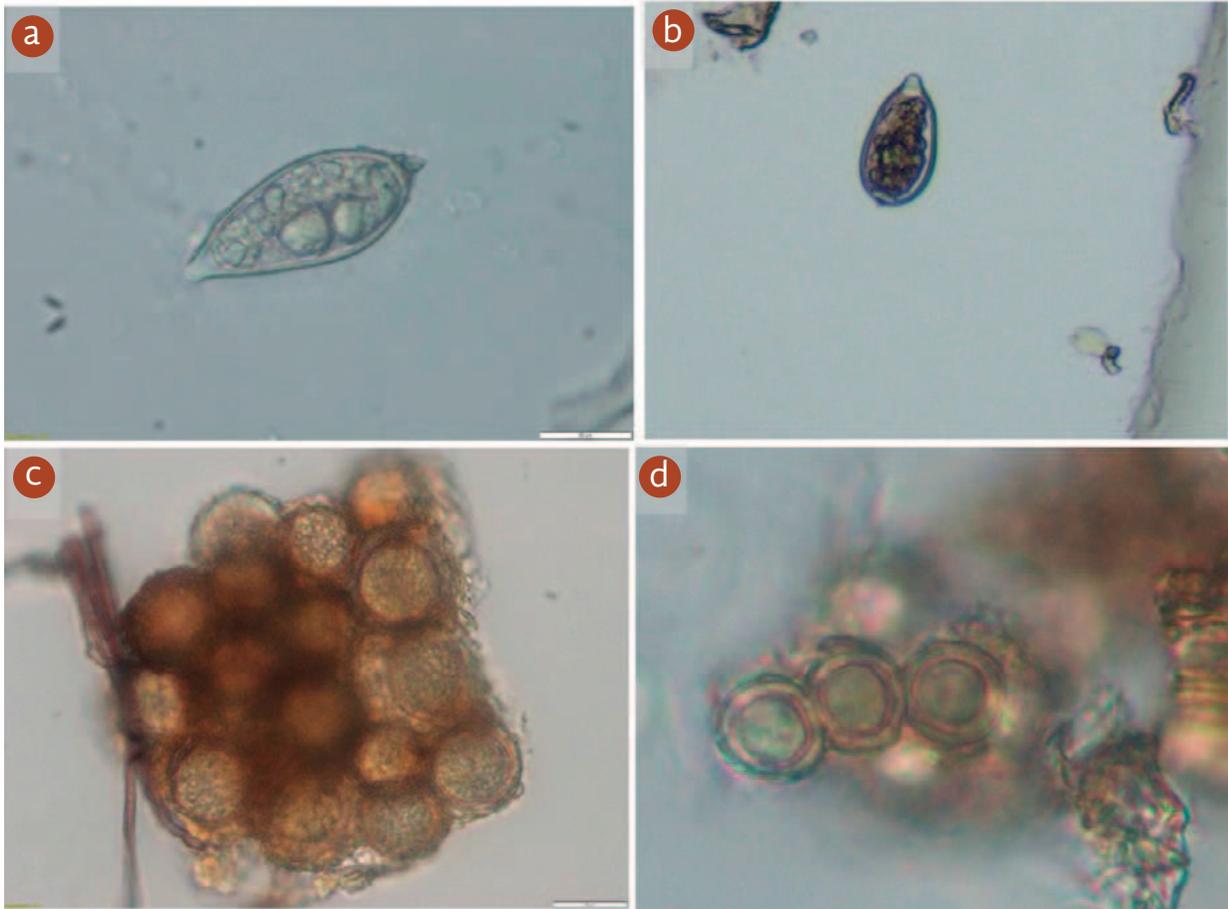
**Figura 14.** Actividad antagonica (Metabolitos no volátiles) de *Trichoderma* spp. frente a *P. palmivora*.



**Figura 15.** Actividad micoparasitica de aislamientos de *Trichoderma* sp. sobre *P. palmivora*, agente causante de la Pudrición del cogollo.

**Tabla 4.** Presencia de estructuras de *Phytophthora* en muestreos de suelo en la plantación Pravia S.A.

Muestreo	Punto	Esporangios	Clamidosporas	Estructuras similares a Oosporas
1	1	+	-	-
1	2	+	-	-
1	3	+	+	-
1	4	+	+	-
1	5	-	+	-
1	6	+	-	-
1	7	+	-	-
1	8	-	+	-
1	9	-	+	-
1	10	+	-	-
3	1	+	-	+
3	2	-	-	-
3	3	+	+	+
3	4	+	-	-
3	5	+	+	+
3	6	-	-	-
3	7	+	-	+
3	8	-	-	-
3	9	-	-	+
3	10	-	-	-
5	1	+	+	-
5	2	-	-	-
5	3	+	-	-
5	4	+	-	-
5	5	+	+	-
5	6	-	-	-
5	7	-	-	-
5	8	-	-	-
5	9	-	-	-
5	10	-	-	-



**Figura 16.** Estructuras de *P. palmivora* observadas en residuos de cosecha – seis meses después de la eliminación. **a. y b.** Esporangios; **c y d.** Clamidosporas y posibles oosporas, (estructuras con tres paredes).

## Agradecimientos

Los autores agradecen al doctor José Ignacio Sanz Scovino, Director General de Cenipalma, por su confianza y apoyo permanente; al Fondo de Fomento Palmero y a Fedepalma. Al Ministerio de Agricul-

tura y Desarrollo Rural, por el aporte al desarrollo del Convenio 0284 de 2015. Al Dr. Rafael Rey, por su invaluable aporte y apoyo al desarrollo de la investigación en la búsqueda de alternativas biológicas. A los Gerentes, Ingenieros Agrónomos y funcionarios de las plantaciones de la Zona Central, quienes han contribuido al desarrollo de esta investigación.

## Referencias bibliográficas

Aya, H., & Martínez, G. (2011). Manejo de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite en el Campo Experimental Palmar de La Vizcaína. *Palmas*, 32(2), 35-44.

- Drenth, A., & Goodwin, S. (1999). Population structure: Oomycetes. pp. 195-224. In: *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Drenth, A., & Sendall, B. (2001). *Practical guide to detection and identification of Phytophthora*. Brisbane: CRC for Tropical Plant Protection.
- De Rojas, P. E., & Ruiz, B. E. (1972). *Investigaciones sobre la Pudrición del cogollo-Pudrición de la flecha de la palma africana de la plantación La Arenosa, de Coldesa S.A. (Turbo) (Departamento de Antioquia)*. Internal report.
- Martínez, G., & Torres, G. A. (2007). Presencia de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite (PC) en palmas de vivero. *Palmas*, 28(4), 13-20.
- Martínez, G. (2008). Avances en la solución de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 29(2), 53-64
- Martínez, G. (2009). Identificación temprana y manejo integrado de la Pudrición del cogollo. *Palmas*, 30(2), 63-77.
- Martínez, G., Arango, M., Torres, G. A., Sarria, G., Vélez, D., Rodríguez, J., Mestizo, Y., ... & Guest, D. (2013). Avances en la investigación sobre las dos enfermedades más importantes en la palma de aceite en Colombia: la Pudrición del cogollo y la Marchitez letal. *Palmas*, 34(1), 39-47.
- Morales, L., Sarria, G., Torres, G., Varón, F., & Martínez, G. (2009). Experiencias en el manejo de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en la Zona Central Colombiana. *Fitopatología Colombiana*, 32(2), 57-61.
- Ochaiai, N., Dragiila, M. I., & Parke, J. L. (2011). Pattern swimming of *Phytophthora citricola* zoospores: An example of microbial bioconvection. *Fungal Biology*, 115, 228-235.
- Sarria, G. A., Torres, G. A., Vélez, D., Rodríguez, J., Noreña, C., Varón, F., Coffey, M., ... & Martínez, G. (2008). Caracterización morfológica y molecular de *Phytophthora palmivora*, agente causal de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 32(2), 39-44.
- Sarria, G. A., Varón, F., Martínez, G., Drenth, A., & Guest, D. (2013). Nuevas evidencias del cumplimiento de los postulados de Koch en el estudio de las relaciones *Phytophthora palmivora* y la Pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 34(4), 41-45.
- Sarria, G., Martínez, G., Varón, F., Drenth, A., & Guest D. (2015). Histopathological studies of the process of *Phytophthora palmivora* infection in oil palm. *European Journal Plant Pathology*, 145(1). DOI 10.1007/s10658-015-0810-9
- Torres, G. A., Sarria, G. A., Varon, F., Coffey, M. D., Elliott, M., & Martinez, G. (2010). First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on African oil palm (*Elaeis guineensis*) in Colombia. *Plant Disease*, 94(9), 1163.