

COMENTARIOS SOBRE EL MANEJO DE LAS ENFERMEDADES MARCHITEZ LETAL,

en Palmar del Oriente S.A., y la pudrición de cogollo,
en Palmas de Tumaco S.A.

OIL PALM DISEASES OF LETHAL WILT

in Palmar de Oriente S.A. and But Rot in Palmas de
Tumaco S.A.

AUTORES



Fernando Rodríguez N.

Palmar de Oriente,
Palmas de Tumaco,
frodri@palmas-tumaco-
oriente.com.co

Palabras CLAVE

Palma de aceite, marchitez
letal, pudrición de cogollo.

Oil palm, lethal wilt, but rot.

En el Palmar del Oriente, en el año 1994, en pleno ataque de la enfermedad pudrición de cogollo, se observaron unas palmas con una sintomatología diferente, presentaban secamientos en algunas hojas medias y bajas, además de la pérdida de brillo y pudrición en los frutos de los racimos maduros y en ocasiones en racimos verdes; inicialmente se creyó que era una variante de la sintomatología conocida, pero después, mientras las palmas con pudrición se recuperaban y aquellas morían, por recomendación de la doctora Esther Ruiz, viróloga de un instituto cubano, se tomaron muestras de tejido del bajo meristemo y de las flechas, las mismas que fueron remitidas al Ciat para someterlas a un análisis con microscopía electrónica; los resultados mostraban la presencia de un microorganismo que, en ese momento, se denominó un micoplasma.

Los casos con esta sintomatología dejaron de presentarse, pero en el año 2000 aparecieron nuevamente, aunque muy pocos; ya en añosos años 2002 y 2003 surgieron una gran cantidad de casos en las siembras 87 material Avros X Deli. Se procedió a tomar muestras de tejido, con el fin de determinar qué tipo de microorganismo estaba presente.

Con la ayuda de algunos asesores (Franqueville, Arbelaez, etc) se descartaron hongos y se concentraron los esfuerzos en la búsqueda de bacterias y/o algún otro microorganismo causal.

BACTERIAS

Se hicieron aislamientos de 102 muestras de diferentes tipos de tejido de las palmas, meristemo, hojas y raíces bajo meristemo; y aunque se detectaron diferentes tipos de bacterias, al realizar pruebas con plántulas de previvero no se detectó ninguna patogénica.

Junto con Palmas del Casanare y Palmas Santana, se enviaron muestras al laboratorio de fitopatología de yuca del Ciat para que, por secuenciación, fueran detectados posibles fitoplasmas; esta ruta se fundamentó en la primera experiencia con microscopía electrónica hecha en 1994.

DETECCIÓN POR PCR EN TEJIDO VEGETAL E INSECTOS

Se amplificaron muestras de ADN de palmas sanas e infectadas, así como de malezas presentes en los lotes afectados, mediante PCR directo y PCR-anidado. Para la primera amplificación se utilizaron las parejas de cebadores P1/P7 o R16mF2/R16mR1 bajo las siguientes condiciones: 100 ng de ADN, 1X buffer, 3mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 0.1 μM de cada cebador y 1U *Taq* polimerasa (CIAT). Para el uso de los cebadores P1/P7 se realizaron 35 ciclos en un termociclador PTC-100 bajo las siguientes condiciones: 30 seg. (90 seg. para el primer ciclo) de denaturación a 94°C, apareamiento por 50 seg. a 55°C, y extensión del cebador por 80 seg. (10 min. en el ciclo final) a 72°C; para los cebadores R16mF2/R16mR1 se realizaron 28 ciclos, utilizando de igual forma las otras condiciones. Los productos de PCR fueron diluidos 1:50 con agua destilada estéril, para utilizarlos como ADN molde, en cantidad de 1 μl, en el PCR anidado. Este PCR se amplificó con las parejas de cebadores R16F2n/R16R2 y Fu5/Ru3, con una temperatura de alineamiento de 50°C y 53°C, respectivamente. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar las bandas.

PCR-RFLP

Para determinar el grupo de fitoplasma con el fin de clasificarlos, los fragmentos amplificados fueron dige-

ridos con las enzimas de restricción *MspI*, *AluI* y *TaqI*. Se tomaron 5.4 ml del producto de PCR y se adicionaron 2 ml del tampón de la enzima 10X y 0.6 ml de la enzima de restricción (500 unidades/μl) y se completó con agua a un volumen final de 20 μl. Se incubó esta suspensión durante 16 horas a 37 °C (la enzima *TaqI* se incubó a 65 °C), luego se le adicionaron 3 ml de buffer de carga (Azul de Bromofenol 0.25%, Glicerol en agua al 30%) y se corrió la electroforesis en Synergel a 6 h a 100 V – 24 mA en tampón de TBE 1X, tiñendo el gel en bromuro de etidio de 10 mg/ml.

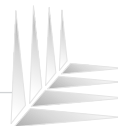
ANÁLISIS DE SECUENCIA

El producto amplificado a partir del PCR anidado se purificó adicionando un volumen de una solución al 20% de polietilenglicol (PEG) con 2.5M de NaCl, para ser posteriormente secuenciado. Se hizo un análisis adicional de secuencias, utilizando ADN clonado, para lo cual los productos de PCR purificados fueron ligados a un plásmido. Posteriormente se transformaron células competentes por electroporación y se sembraron en medio de cultivo selectivo. Se seleccionaron las colonias que presentaron una coloración blanca, que son las que poseen el clon, correspondiente al fragmento amplificado. El ADN del plásmido que contenían los clones con el fragmento del tamaño esperado, se purificó para secuenciar. El análisis de secuencia fue hecho con los programas SEQUENCHER 4.1, y DNAMAN 4.13, y la homología de secuencias con ADN de fitoplasmas reportados, se buscó en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante la herramienta Blastn.

SECUENCIACIÓN DE ADN

Se determinó la secuencia de la banda de ADN, de 1,200 nucleótidos, utilizando los cebadores R16F2n/R16R2 y Fu5/Ru3, y se comparó con la secuencia de fitoplasmas reportados en el GenBank, mediante la herramienta Blastn. Algunos de los fragmentos amplificados se clonaron en *Escherichia coli* y se secuenciaron utilizando cebadores T7 y Sp6.

Las secuencias de fitoplasma analizadas en este estudio, mostraron homología de 92% con secuencias del grupo 16rI (Aster Yellow) y 93% con el grupo 16rIV (Coconut Lethal Yellowing); también se tuvieron



homologías de 94% con *Acholeplasma palmae*, pertenecientes los tres a la familia Acholeplasmataceae.

Después de estudiar los resultados obtenidos en los análisis para los diferentes microorganismos, queda por profundizar los trabajos en fitoplasmas, con el fin de llegar (sí es un fitoplasma el organismo causal) a una secuenciación e identificación del 100% del fitoplasma encontrado en el tejido de las palmas, y de los insectos sospechosos de ser el vector de paso hacia la palma.

Los trabajos con hongos están descartados, y aunque no se han descartado del todo las bacterias parece ser que tampoco están involucradas con la enfermedad.

PUDRICIÓN DE COGOLLO PALMAS DE TUMACO

La pudrición de cogollo existe en la zona de Tumaco hace unos veinticinco años, pero hacia mediados del año 2004 tomó un carácter endémico, esta enfermedad se caracteriza en la zona por ser letal.

Desde que apareció en esta nueva etapa, la sintomatología de la enfermedad ha cambiado, y es

posible que, al no verse afectado el meristemo desde los primeros síntomas, haya oportunidad de recuperar las plantas enfermas. Con tal fin se han implementado algunas estrategias para ayudar en el control; la estrategia básicamente consiste en el uso de un hongo antagonista de hongos patógenos. *Trichoderma harsianum* es un hongo muy utilizado en otros cultivos, como flores, banano y algunos frutales; la cualidad de este microorganismo es la producción de antibióticos que limitan el crecimiento de hongos patógenos, además de competirles por nutrientes y agua. La aplicación de *Trichoderma* junto con la intervención del suelo mejorando sus condiciones de infiltración y pH han ayudado a desacelerar la velocidad de la enfermedad.

Es preciso investigar qué otras acciones podrían ayudar a estimular el crecimiento de nuevos tejidos, posiblemente el uso de giberelinas, además de acciones como el incremento en la captura del *Rhizophorus*. Es importante tomar medidas que permitan ayudar, de cualquier manera, las palmas a recuperarse, lo único que no se podría hacer sería abandonar los cultivos.