

Microorganismos asociados a la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite y su inoculación en palmas de vivero

Microorganisms Associated with Bud Rot in Oil Palm and their Inoculation in Nursery Palms

AUTORES

Greicy A. Sarria;
Gabriel A. Torres;
Héctor A. Aya;
Josué G. Ariza;
Jessica Rodríguez;
Diana C. Vélez;
Francia Varón;
Gerardo Martínez.

Programa de Investigación de la Pudrición del cogollo. Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma).
Calle 20A N° 45A - 30, piso 4°.
A.A: 252171, Bogotá, Colombia.
gerardom@cenipalma.org

Palabras CLAVE

Pudrición del cogollo, PC,
Palma de aceite, Phytophthora.

Bud rot, PC,
Oil palm, Phytophthora

Recibido: 6 noviembre 2008
Aceptado: 13 noviembre 2008

Resumen

En el estudio de los posibles microorganismos asociados con la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite en Colombia, se procedió a aislar, identificar, purificar, desarrollar en medios artificiales y adelantar pruebas de patogenicidad con los agentes que, de acuerdo con la literatura y la experiencia de los investigadores, podrían tener mayores probabilidades de causar la enfermedad. Estos condujeron a descartar como responsables de la PC a *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp., *Diplodia* sp. o *Lasioidiplodia* sp., así como a las bacterias de los géneros *Erwinia* y *Pseudomonas*, todos ellos encontrados frecuentemente en estados avanzados de desarrollo de la enfermedad. Los síntomas de la enfermedad no pudieron ser reproducidos en las inoculaciones de palmas con los diferentes aislamientos de estos hongos o bacterias.

Summary

In the study of the microorganisms associated with the bud rot (PC) disease of the oil palm in Colombia, it was possible to isolate, identify, purify, growth in artificial media and develop pathogenicity test of the different agents that according with the literature and the experience of the research team might be associated with the disease. These studies indicated that the PC is not started by *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp., *Diplodia* sp. o *Lasioidiplodia* sp., as well as



with bacteria of the genus *Erwinia* or *Pseudomonas*, all of them observed frequently in advanced stages of the disease. The symptoms of the disease were not reproduced when oil palms were inoculated with different isolates of these fungi or bacteria.



Introducción

La PC es una enfermedad registrada por primera vez en Colombia en 1964 y fue uno de los factores determinantes de la desaparición o seria afectación de una plantación en Turbo, departamento de Antioquia, Noroeste de Colombia, cerca de la frontera entre Colombia y Panamá (De Rojas y Ruíz, 1972; Gómez *et al.*, 1995; Ochoa y Bustamente, 1979). Situaciones similares se han presentado en otras zonas palmeras en Colombia, como los Llanos Orientales, el Magdalena Medio, Tumaco, Guapi y, posiblemente, fue la responsable de la desaparición de los cultivos en el Bajo Calima en el departamento del Valle del Cauca (Martínez, 2008; Martínez *et al.*, 2008a, b; Nieto, 1996; Sarria *et al.*, 2008; Torres y Martínez, 2007; Torres *et al.*, 2008a, b). En Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Ecuador, Brasil, Surinam, Perú y Venezuela también se presentan situaciones similares (Franquerville 2001; 2003).

Los primeros registros sobre un síndrome similar en Palma de aceite se remontan a 1928, cuando Chesquière (1935, citado por Richardson, 1995) señala que durante ese período el síndrome de la PC fue observado en África Central. Síntomas similares también fueron descritos en la región de Sibiti, en Congo (Brazzaville, citado por Bachy, 1954; Duff, 1963). En Ecuador, las primeras observaciones precisas sobre la PC datan de 1976, pero es probable que la enfermedad haya estado presente allí durante varios años (Dzido *et al.*, 1978). Hoy, Colombia, Ecuador y Brasil son el epicentro de problemas relacionados con la PC.

Posible origen patológico.- Existen registros de un patógeno asociado con la PC desde 1962, cuando Kovavich, citado por Ochoa, (1974), mencionó que *Phytophthora* sp., estaba asociado con la enfermedad. Según Turner (1981), de palmas con PC en el Congo, Malasia, Panamá y Venezuela se han aislado 12 hongos.

En Palmeras del Ecuador (PDE), se estudió la microfiora asociada a la PC de la Palma de aceite y se encontraron principalmente los hongos de los géneros *Phoma*, *Cephalosporium*, *Pirenochaeta*, *Pestalotia* y *Colletotrichum* (Quillec, 1983).

En la Estación Experimental Santo Domingo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP) concluyeron que *Fusarium oxysporum*, y *F. roseum* estaban asociados con la PC (Chávez, 1974), y Ochoa y Bustamante (1979), en Urabá, encontraron el hongo *F. moniliforme* var. *subgluinans* y reprodujeron los que consideraron síntomas de la Pudrición de flecha, pero sin que descendiera al cogollo.

En Colombia, Sánchez y sus colaboradores (1999) hicieron la primera descripción de los síntomas y aislaron algunas especies de *Fusarium* sp., pero no lograron reproducir la enfermedad.

Nieto (1996) en los Llanos Orientales aisló varios hongos, entre ellos *Thielaviopsis* sp. y *F. solani*, y por la abundancia y patogenicidad en otros cultivos consideró que este último era el más probable agente causal de la enfermedad, sin embargo, fracasó en su intento de reproducirla con cultivos puros en medios de cultivo.

Existen registros previos a los trabajos en el continente americano que mencionan a la PC, y en ellos se considera su posible agente causal. Por ejemplo, Bachy (1954) percibió una fuerte asociación entre la enfermedad y algunas bacterias, así como con hongos del género *Fusarium*, principalmente *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. roseum*, pero la inoculación artificial de estos diferentes microorganismos terminó sin resultados definitivos sobre el verdadero responsable de la enfermedad. En 1935, Ghesquiere (citado por Bachy, 1954) considera dos agentes causales de la



PC de la Palma de aceite: *Phytophthora palmivora* y *Bacillus coli*. Duff (1962) atribuye la enfermedad a una bacteria.

En América Latina (Renard, 1976, citado por Franqueville, 2001, 2003), realizó aislamientos microbiológicos de las palmas afectadas en Turbo, mostrando el predominio de cepas de *Fusarium* (*F. oxysporum* y *F. solani*) y bacterias en los tejidos enfermos. Los esfuerzos por inocular artificialmente estos microorganismos, separadamente o asociados, no reprodujeron los síntomas de la enfermedad.

Munévar y Acosta (2002) le dan un valor muy importante, en el desarrollo de la enfermedad, al manejo de la plantación, la preparación de los suelos antes de la siembra y, especialmente, de sus drenajes internos y externos, así como el correcto balance de nutrientes. Albertazzi y colaboradores (2005) consideraron que no se había asociado de manera irrefutable a la enfermedad con un patógeno determinado y postulan que la PC es el resultado de un desorden fisiológico asociado con uno o más tipos de estrés.

La etiología de la enfermedad se ha asociado en Colombia, entre otros, con tres microorganismos que, en particular, han mostrado la posibilidad de estar involucrados en la manifestación patológica, siendo ellos: *Thielaviopsis* sp. y *Fusarium* spp. A ellos se suman organismos del reino Cromista, pertenecientes al orden Pythiales (Cenipalma, 1994; Nieto *et al.*, 1996; Nieto, 1996; Sánchez *et al.*, 1999, Ayala *et al.*, 2000).

Los resultados de las investigaciones realizadas por Cenipalma muestran que uno de los agentes involucrados en el desarrollo de la enfermedad, en la Zona Oriental, es el hongo *Thielaviopsis paradoxa*, existiendo evidencias de que diferentes aislamientos pueden tener distintos grados de virulencia (Nieto, 1996; Nieto *et al.*, 1996).

Además de este hongo, en estudios previos de agentes causales de PC en diferentes especies de palmas se han identificado microorganismos como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, y bacterias del género *Erwinia*, entre otros (Ayala *et al.*, 2000; Franqueville, 2001, 2003; De Rojas y Ruiz, 1972; Genty *et al.*, 1978; Nieto, 1996; Nieto *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1999; Turner, 1981); sin embargo, su patogenicidad no ha sido plenamente comprobada. Según Nieto y colaboradores

(1996), los tres géneros reprodujeron la enfermedad al ser inoculados en el cogollo, pero, *Thielaviopsis* sp., aparentemente mostró una mayor virulencia.

Nieto y colaboradores (1996) obtuvieron el secamiento y la pudrición de flechas en plantas inoculadas con los tres microorganismos. En palmas de ocho meses de edad se observó que los primeros daños en la flecha aparecieron entre seis y diez días después de la inoculación con *Thielaviopsis* sp., mientras que con los otros patógenos aparecieron entre ocho y doce días.

Trabajos con palmas de 8, 30 y 72 meses con *Thielaviopsis* sp., *Fusarium* sp. y *Pythium* sp., presentaron reacciones positivas, expresando síntomas en períodos desde 7 a 26 días después de la inoculación (Nieto, 1996).

Nieto (1996) afirma que al inocular cepas de *Fusarium solani* y *Thielaviopsis* sp., se logró la reproducción de síntomas de la enfermedad en palmas de ocho meses de edad. Sin embargo, al realizar los reaislamientos, sólo se encontró similitud morfológica de las cepas inoculadas con *Thielaviopsis* sp.

El análisis de tejidos internos mostró que las plantas inoculadas con *T. paradoxa* mostraban descomposición del cogollo con mayor frecuencia, mientras que las inoculadas con *F. solani* tenían los tejidos suberizados y se recuperaban más rápido (Nieto, 1996).

Sánchez y colaboradores (1999) afirman que en condiciones de laboratorio, *Phytophthora* spp., afecta las palmas y produce una sintomatología semejante a la PC, pero su efecto es más marcado cuando se trabaja simultáneamente con *T. paradoxa*.

Según Nieto (1996), la frecuencia con que se han obtenido síntomas mediante inoculaciones en las que se encuentra involucrado *T. paradoxa* solo o mezclado con otros hongos, indica su relación con la enfermedad; por eso afirma que la patogenicidad de *Thielaviopsis* sp., fue mayor que las de otros hongos inoculados. Además, según este investigador, con éste microorganismo se cumplieron los postulados de Koch, verificando su asociación directa con la PC.

Nieto (1996) identificó a *T. paradoxa* como agente causante de la PC, mediante el uso de la técnica de inyección al cogollo, induciendo pudrición de flecha y cogollo, variando solamente el tamaño de la aguja

en relación con la edad de las palmas empleadas. Las plantas se mantuvieron en inundación permanente o se sometieron a un riego saturado cuando se hicieron inoculaciones en el campo.

Nieto (1996) también reporta la necrosis de plántulas inoculadas mediante absorción a raíz desnuda de la suspensión de conidias. Métodos como la microinyección al estípite, algodón humedecido con esporas en las raíces y la absorción radical, no mostraron eficiencia en la reproducción de síntomas.

La enfermedad se logró reproducir inoculando *T. paradoxa* en plántulas de seis meses de edad, con un método que consiste en cortar dos hojas, una interna y otra externa, con una tijera previamente sumergida en la suspensión de inóculo. Las condiciones a las que se sometieron las plantas fueron de 90 y 92% de

En los últimos años la PC se ha incrementado exponencialmente en diferentes regiones del país.

humedad relativa (HR), además de una temperatura de 18 y 27° C. Los resultados indicaron que el mayor avance en el daño de la flecha se observó a 18° C y 90% de HR. (Cenipalma, 1998).

Sánchez y colaboradores (1999) reportaron la presencia de síntomas en palmas de 8 y 18 meses, inoculadas mediante punción en el estípite con suspensión e introducción del inóculo en la herida. Los hongos inoculados fueron *T. paradoxa* y *Phytophthora* spp., individualmente y en mezcla.

Otras metodologías empleadas han sido la inoculación con discos del hongo, tomados directamente del medio de cultivo y depositados en la superficie de la flecha a la que previamente se le ha practicado una herida. Una variación de esta metodología es la realización de una incisión en la flecha, sobre la que se deposita la suspensión del inóculo (Sánchez et al., 1999).

Se han probado también otros métodos que consisten en realizar incisiones en la base peciolar y lesiones en

el estípite, sobre las que se deposita el inóculo, con un rango de temperaturas variables oscilando entre 25 y 30° C. La HR, dependiendo del tipo de método utilizado, en rangos desde 70 hasta el 100%; los mayores porcentajes fueron empleados para tratamientos que implicaran la utilización del medio de cultivo (Sánchez et al., 1999).

A pesar de todas las investigaciones mencionadas, continuaron las dudas sobre el verdadero responsable de la enfermedad, hasta los trabajos recientes de Martínez y colaboradores (2008a) y Sarria y colaboradores (2008), en los cuales se confirma el papel de *Phytophthora* sp., como el responsable de iniciar el proceso de infección de la PC. Recientemente, la enfermedad se está presentando de manera muy temprana en plantas de vivero y esto ha facilitado el proceso de verificación de la patogenicidad (Martínez y Torres, 2007).

Phytophthora palmivora ha sido reportada en la Florida (USA), ocasionado PC en 23 especies de palmas (Garofalo y MacMillan, 2004), y hay registradas, por lo menos, dos especies de *Phytophthora* como responsables de la misma enfermedad en el cocotero (Steer y Coates-Beckford, 1991).

Teniendo en cuenta que en los últimos años la PC se ha incrementado exponencialmente en diferentes regiones del país y que al momento de iniciar este estudio no se conocía con certeza su agente causal primario, se planteó la necesidad de retomar los estudios en las zonas Occidental y Central de Colombia e iniciar un trabajo tendiente a aislar, identificar e inocular los principales microorganismos asociados con la PC en los diferentes estados de desarrollo de la infección.

Metodología

Toma de muestras

Se tomaron muestras en campo en las zonas Central y Occidental de Colombia, de plantas adultas recién transplantadas a sitio definitivo, y de vivero, que presentaban los síntomas de la enfermedad en diferentes grados de severidad, de acuerdo con la escala desarrollada por Cenipalma (Martínez y Torres, 2008). Se tomaron trozos pequeños de tejido enfermo con tejido adyacente sano, los cuales se colocaron en tubos de vidrio con Tween 20 y se refrigeraron para ser llevados



al laboratorio de Cenipalma, en Tumaco, en el caso de la Zona Occidental, y al Campo Experimental el Palmar de La Vizcaína, para el de la Zona Central. Lo anterior, teniendo en cuenta que ya existían experiencias en Cenipalma, Tumaco; que este es un procedimiento que permite evitar la oxidación y contaminación rápida del tejido enfermo de la palma.

Todas las muestras tomadas en campo se identificaron con el respectivo nombre de la plantación, lote, edad, municipio y material afectado. A cada muestra se le dio un código que permitió su identificación a lo largo de todo el proceso adelantado con cada una.

Aislamiento y purificación de microorganismos

A partir de tejido procedente de plantas enfermas en diferentes estados de infección, se realizaron los aislamientos, utilizando varios medios de cultivo, simultáneamente, para crear las oportunidades de desarrollo de todo el amplio rango de microorganismos que han sido observados en las palmas afectadas y que permitieran seleccionar posibles agentes causales de la enfermedad y descartar aquellos que, por su hábitat, han sido considerados como contaminantes.

Como se ha indicado previamente, se emplearon diferentes medios de cultivo, teniendo en cuenta algunos de uso general y otros selectivos para el aislamiento de Cromistas, Deuteromicetes y Basidiomicetes, tales como Papa Dextrosa Agar (PDA acidulado), PDA + bactericida (Papa – Dextrosa – Agar + Estreptomocina), Agar Avena (Agar + Avena + Antibióticos), Agar Agua (Agar), Agar Jugo V8 (Agar V8) y Agar extracto de Malta. Para el caso de bacterias todos los aislamientos iniciales se realizaron en Agar Nutriente. Cuando se consideró necesario, se prepararon cámaras húmedas para promover el desarrollo de los microorganismos.

Aislamiento de hongos y cromistas

Se tomaron trozos de tejido enfermo de aproximadamente 0,5 cm. de largo, se lavaron con Tween y luego con agua a chorro durante dos horas como mínimo. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar se realizaron nuevos lavados para desinfectar el tejido y eliminar posibles contaminantes, primero con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, luego con

alcohol al 70% durante 30 segundos y, finalmente, dos veces con agua destilada estéril. El tejido desinfectado y enjuagado se colocó sobre papel toalla estéril entre cinco a diez minutos para eliminar el exceso de agua y obtener un tejido más seco. Posteriormente se sembró en los diferentes medios de cultivo, colocando cinco trozos por caja de petri.

Ante la aparición de microorganismos fungosos se inició de manera temprana el proceso de purificación de colonias, para evitar posibles contaminaciones. Con cada uno de los aislamientos se realizaron las siembras que fueron necesarias para disponer de cultivos puros.

Aislamiento de bacterias

Se tomaron trozos de tejido de 1 a 1,5 cm. aproximadamente. El proceso de lavado y secado de muestras se hizo de manera similar al de los hongos. A continuación, trabajando en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, se introdujo el tejido en tubos con solución salina estéril por un período de 20 minutos. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^6 ; las últimas tres diluciones se sembraron en 50 microlitros en Agar nutritivo por duplicado; posterior a la siembra se incubaron las cajas a 28 - 30° C entre 24 a 72 horas.

A partir de las siembras en Agar nutriente se realizaron separaciones de colonias hasta la obtención de aislamientos puros.

Decoloración y tinción de tejido

Tejido aparentemente sano y tejido enfermo fue sometido a un proceso de decoloración con hipoclorito de sodio o hidróxido de potasio para aclararlo y luego teñirlo con azul de metileno. Posteriormente se montaron placas para realizar las observaciones al microscopio y detectar estructuras de resistencia o signos de microorganismos que pudieran servir para la detección temprana de la enfermedad o verificar supervivencia en los residuos de cosecha.

Identificación de hongos y cromistas

A partir de aislamientos puros se realizó la identificación a nivel de género, teniendo en cuenta las características culturales de la colonia y mediante observaciones microscópicas del micelio y de las

estructuras reproductivas, para hacer las comparaciones correspondientes con las claves para estos microorganismos (Agrios, 2005; Barnett *et al.*, 1998; Erwin y Ribeiro, 1996).

Identificación de bacterias

Se utilizaron las colonias puras con 24 horas de crecimiento y se identificaron teniendo como base la morfología de las colonias, tinción de Gram, pruebas bioquímicas y crecimiento en medios diferenciales. (Schaad *et al.*, 2001).

Conservación y mantenimiento de cepas

Las cepas puras de hongos y cromistas se conservaron en papel filtro Waltman #3 a -20° C. Mientras que las cepas puras bacteriales se conservaron en viales estériles con agua destilada estéril a -20° C.

Pruebas de patogenicidad

Para realizar las pruebas de patogenicidad se tomaron únicamente aislamientos de microorganismos puros con períodos de crecimiento no superiores a ocho días, en el caso de hongos y cromistas; en el caso de las bacterias, sólo con 24 horas de crecimiento.

En todos los casos se inocularon 15 plantas por aislamiento, de las cuales cinco correspondieron al testigo. Las inoculaciones se realizaron en plantas sanas de vivero y en plántulas crecidas en laboratorio, con diferentes métodos (Figura 1):

Punción: consistió en tomar con una aguja y punzar tejido de la flecha más joven del cogollo de la planta; sobre este tejido se colocaron trozos de crecimiento del patógeno en medio de cultivo, los cuales se cubrieron con papel Parafilm para evitar deshidratación rápida del microorganismo. En el caso de las colonias bacteriales se realizó la herida y sobre ella se depositó una gota de la suspensión bacterial concentrada.

Sin herida: consistió en poner un disco de medio de cultivo con el crecimiento del microorganismo en la base de la flecha más joven; posteriormente se cubrió con Parafilm para evitar la deshidratación. Este método fue utilizado sólo en el caso de hongos y cromistas. *Suspensión:* se prepararon suspensiones concentradas tanto de hongos como de bacterias y se depositaron sobre la base de la flecha más joven.

Inyección: se prepararon suspensiones de los microorganismos obtenidos y se ubicaron, con la ayuda de jeringas hipodérmicas, en la base de las flechas más jóvenes. Las jeringas se dejaron adheridas para permitir el intercambio con la planta a manera de inóculo permanente y conservar así la identificación del sitio de inoculación.

Palillos: en esta inoculación se procedió de dos maneras: la primera consistió en tomar el crecimiento de hongos y cromistas con la punta del palillo, y luego se enterraron en la base de la flecha más joven, dejándolos hasta que espontáneamente se desprendieran. La segunda consistió en poner los palillos en el medio de cultivo simultáneo a la siembra del microorganismo, para permitir la colonización; una vez se presentó el crecimiento micelial o de la bacteria, se procedió a inocularlo de manera directa en la base de la flecha.

Inoculación directa: una vez comprobada la presencia de estructuras de resistencia en tejido seco en estados avanzados de infección, se procedió a molerlo, cernirlo y depositarlo sobre la base de la flecha más joven.

Inoculación sobre tejido desprendido: se tomaron cogollos y flechas sanos de plantas de vivero, se desinfestaron en condiciones de laboratorio, donde se les brindaron condiciones de humedad para evitar deshidratación. Los microorganismos fueron inoculados por herida en tres sitios a lo largo de la flecha.

En todas las pruebas de inoculación se realizaron observaciones permanentes para detectar la evolución de los microorganismos inoculados y se dejó un registro fotográfico del proceso de evolución de las lesiones.

Reaislamiento y purificación de microorganismos

Se realizaron reaislamientos a partir de aquellos tejidos de plantas con patogenicidad positiva asociada con las lesiones iniciales de la PC. Se tomaron muestras pequeñas para ser llevadas al laboratorio y se procesaron con la misma metodología empleada en los aislamientos iniciales. Posteriormente se verificó y comparó la morfología del microorganismo obtenido con el inoculado.

Cuando se consideró necesario, se tomó tejido de las pruebas de patogenicidad positivas a PC, para realizar decoloración de tejido que permitiera evidenciar la presencia de estructuras de resistencia.

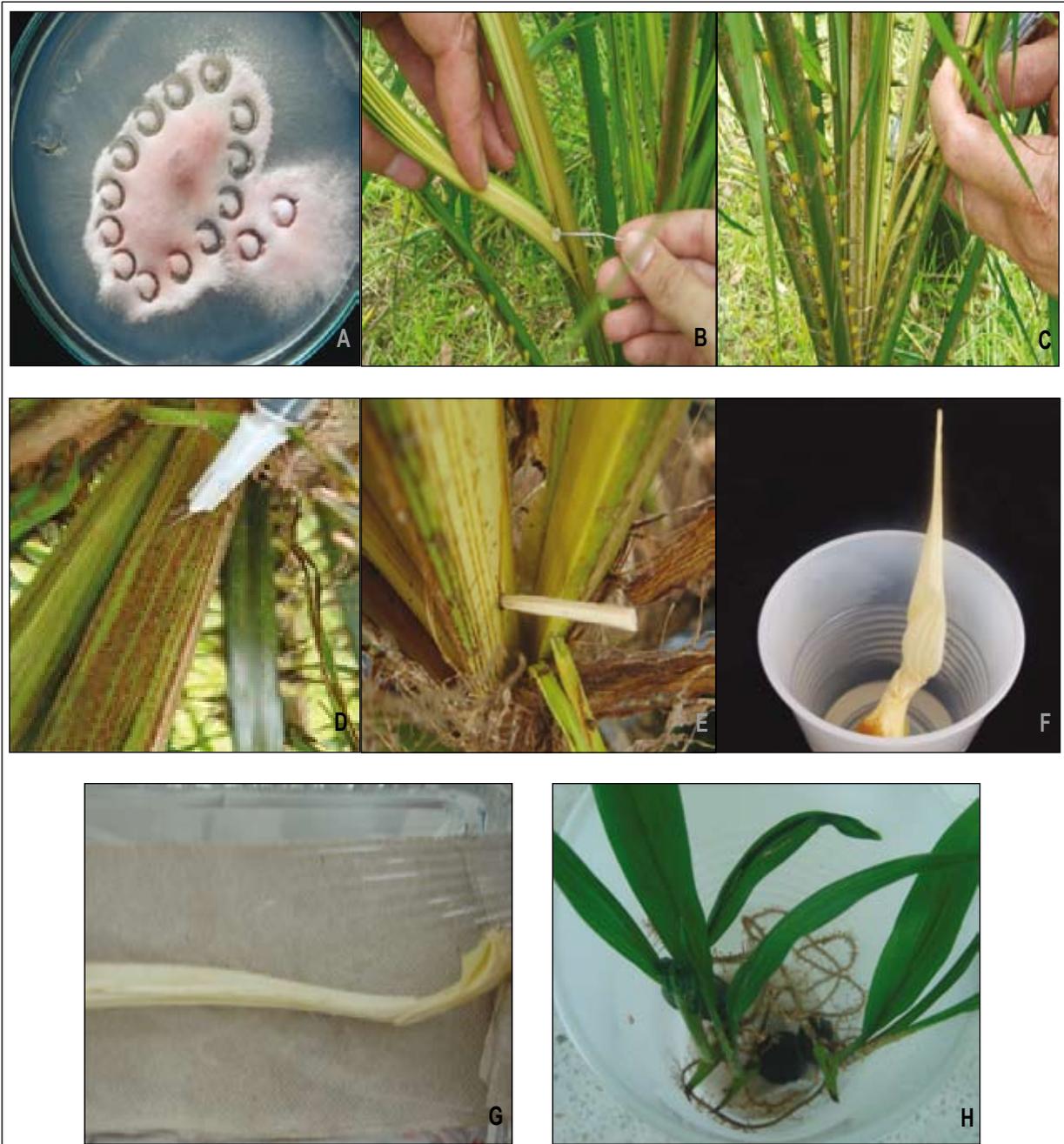


Figura 1. Métodos de inoculación utilizados para pruebas de patogenicidad. A. Disco con crecimiento micelial. B. Con micelio sin punción. C. Con herida + micelio. D. Con Inyección. E. Con palillo. F y G. Con tejido desprendido. H. Con plantas crecidas en laboratorio.

Resultados

Aislamiento, identificación y purificación de microorganismos

En total se tomaron 304 muestras de las zonas Occidental y Central de Colombia, para un total de 1909

aislamientos y más de tres mil purificaciones, desde mayo de 2007 hasta agosto de 2008.

Las muestras analizadas estuvieron conformadas de tejido afectado por la PC en estados iniciales, interme-

dio y avanzados de flechas, folíolos, pecíolos y tejido interno de la zona meristemática. En todos los casos se realizaron siembras de tejido sano como testigo.

Los microorganismos fungosos más frecuentes fueron *Fusarium* spp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Thielaviopsis* sp., *Nigrospora* sp., y algunos micelios estériles que no pudieron ser identificados. Para el caso de bacterias, las más frecuentes fueron *Erwinia* sp y *Pseudomonas*. Como cromistas se aislaron *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. (Tabla 1).

La mayoría de los microorganismos fueron identificados a nivel de género, como se indica en la Tabla 1, basados en las estructuras de reproducción y en el crecimiento micelial (Figura 2).

Tabla 1. Frecuencia de aparición de los diferentes morfotipos aislados de tejidos procedente de palmas afectadas con la PC, en las zonas Occidental y Central	
Microorganismos	% de frecuencia
<i>Alternaria</i> spp.	2,63
<i>Basidiomycete</i> spp.	4,61
<i>Colletotrichum</i> spp.	11,51
<i>Curvularia</i> spp.	1,64
<i>Diplodia</i> spp.	0,66
<i>Fusarium</i> spp.	37,83
<i>Helminthosporium</i> spp.	1,64
<i>Nigrospora</i> spp.	2,63
<i>Pestalotia</i> spp.	8,22
<i>Phytophthora</i> spp.	2,30
<i>Pythium</i> spp.	1,32
<i>Rhizoctonia</i> spp.	3,29
<i>Thielaviopsis</i> sp.	1,64
<i>Trichoderma</i> spp.	3,29
<i>Pseudomonas</i> sp.	0,66
<i>Erwinia</i> spp.	4,93
Otras bacterias Gram -	1,64
Micelio estéril	2,96
Micelio con presencia de esclerocios	3,29
Micelio con Clamidosporas	3,29
Total	100,00

Decoloración y tinción de tejido

En el tejido afectado con la PC que fue sometido a decoloración y posterior tinción, algunas veces se observaron estructuras de resistencia similares a las inducidas por los Oomicetos (Figura 3).

Pruebas de patogenicidad

Desde mayo de 2007 hasta septiembre de 2008 se han inoculado en las zonas Occidental y Central, 79 microorganismos fungosos, bacteriales y cromistas sobre 890 plantas de vivero, 178 plántulas y 36 flechas inmaduras.

Entre los principales géneros inoculados se destacan *Thielaviopsis* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp., *Pestalotia* sp., *Pythium* sp., y *Phytophthora* sp. (Tabla 2) (Figura 3).

Las primeras inoculaciones realizadas en palmas de vivero ubicadas en las plantaciones Astorga, La Miranda y Manigua, en Tumaco, con los microorganismos mostraron ocho días después lesiones de necrosis y clorosis en el borde, sin desarrollar los síntomas típicos iniciales ya descritos para PC (Figura 4).

En las plantas inoculadas en las plantaciones Astorga, La Miranda y Central Manigua en Tumaco, con los aislamientos de los microorganismos encontrados en las lesiones de palmas afectadas por la PC se presentaron dos situaciones. En la primera no se desarrolló lesión alguna alrededor del sitio de la inoculación, indicando que el microorganismo en evaluación no indujo infección en la palma. En la segunda se observaron algunas decoloraciones y necrosis de tejidos, especialmente en inoculaciones con *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestalotia* spp., *Thielaviopsis* sp. y *Rhizoctonia* spp. (Figura 4), pero en ninguno de los casos el desarrollo de la lesión fue similar a los síntomas que Martínez y Torres (2008) y Sarria y colaboradores (2008), han asociado con las lesiones iniciales de la PC de la Palma de aceite, producidas por *Phytophthora* sp., tanto en condiciones de infección natural como en pruebas de patogenicidad con este microorganismo.

En general, en situaciones de alta presión de inóculo en condiciones naturales, como es el caso actual de Tumaco, las pruebas de patogenicidad en palmas de vivero en el de campo se vieron afectadas por infec-

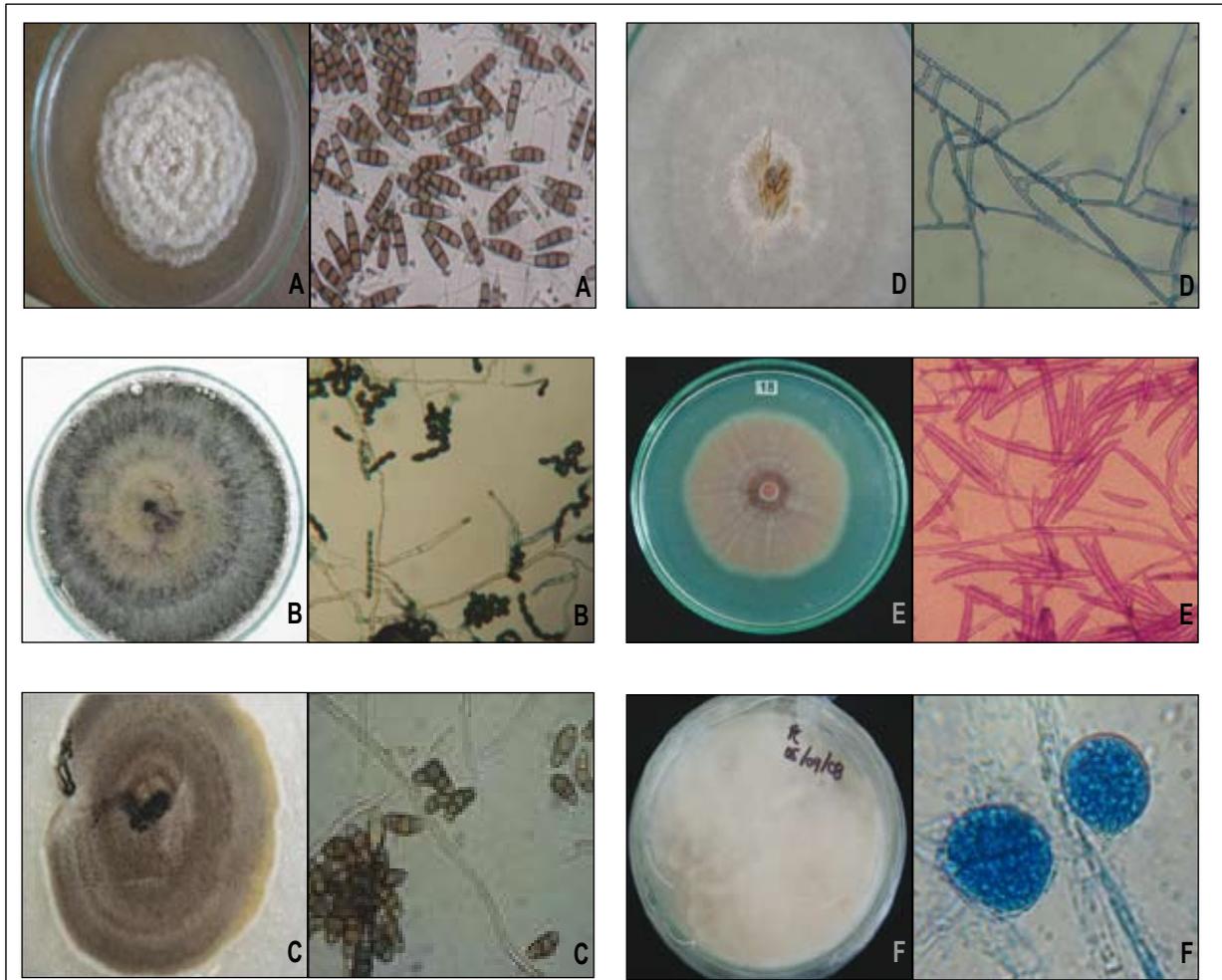


Figura 2. Algunos géneros de microorganismos aislados a partir de tejido del cogollo afectado con la PC. A. *Pestalotia* sp. B. *Thielaviopsis* sp. C. *Curvularia* sp. D. *Rhizoctonia* sp. E. *Fusarium* sp. y F. *Phytophthora* sp.

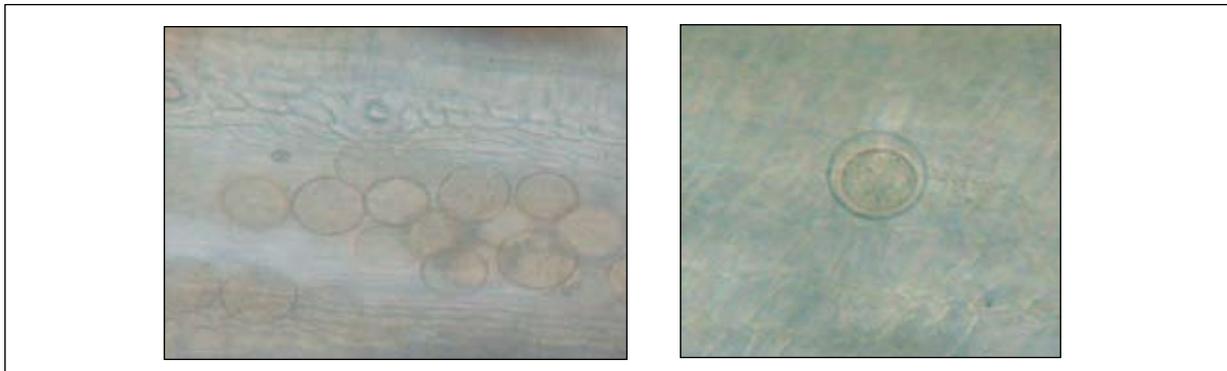


Figura 3. Estructuras de resistencia observados en los tejidos afectados con PC.

ciones no controladas que promovieron el desarrollo de síntomas de la PC tanto en palmas inoculadas como en las testigo.

Este problema se solucionó cuando las pruebas de patogenicidad se desarrollaron en zonas de baja presión de inóculo. En estas últimas se encontró una

correlación entre la labor realizada y los resultados a observar, sin casos de infección en los testigos ni infecciones no controladas.

Tabla 2. Géneros de microorganismos inoculados en las pruebas de patogenicidad	
Géneros	# de aislamientos
<i>Fusarium</i> spp.	15
<i>Phytophthora</i> spp.	4
<i>Collectotrichum</i> spp.	6
<i>Rhizoctonia</i> spp.	3
<i>Nigrospora</i> spp.	2
<i>Thielaviopsis</i> sp.	7
<i>Pestalotia</i> spp.	5
<i>Diplodia</i> spp.	2
<i>Lasiodiplodia</i> spp.	2
<i>Basidiomycete</i> spp.	3
<i>Curvularia</i> spp.	3
<i>Alternaria</i> spp.	2
<i>Helmithosporium</i> spp.	2
<i>Pseudomonas</i> sp.	2
<i>Erwinia</i> spp.	3
Otras bacterias Gram -	5
Micelio estéril	10
Micelio con presencia de esclerocios	5
Micelio con Clamidosporas	2
Total	83

En general, en las plántulas inoculadas con la diversidad de microorganismos que se encuentran en los tejidos necrosados en palmas afectadas por la PC, una vez se logró su aislamiento, purificación y cultivo en medio artificial, no se observó evidencia de necrosamiento alrededor del sitio de la inoculación, y en los casos en que se desarrolló una lesión necrótica, los síntomas no fueron los característicos de las lesiones iniciales de la PC.

En el tejido desprendido solamente se observó degradación de tejido y crecimiento del microorganismo con algunos aislamientos de *Fusarium* sp., *Nigrospora* spp., y *Collectotrichum* spp. (Figura 5).

Conclusiones

- A partir del tejido afectado con la PC en diferentes estados de expresión de síntomas, se aislaron muchos microorganismos, siendo los más frecuentes: *Fusarium* spp., *Collectotrichum* spp., *Rhizoctonia* sp., *Erwinia* sp., *Pestalotia* sp. y *Phytophthora* sp., entre otros.
- En las condiciones de campo en Tumaco, donde existía una presión de inóculo muy alta, fue difícil desarrollar las pruebas de patogenicidad, pues se tenían casos de la enfermedad tanto en las palmas inoculadas como en las testigo.
- La contaminación externa presente en las plantaciones donde se realizaron las primeras pruebas de patogenicidad indujeron una infección muy rápida de PC, impidiendo determinar la acción de los microorganismos inoculados.





Figura 5. Inoculaciones en tejido desprendido del cogollo. A. *Fusarium* sp. B. *Colletotrichum* sp. C. *Nigrospora* sp.

- Con los microorganismos fúngicos y las bacterias inoculadas no se reprodujeron los síntomas típicos de la PC en las inoculaciones realizadas en plantas de vivero, plántulas y tejido desprendido, cuando éstas se realizaron en zonas con una baja presión de inóculo.
- Los microorganismos frecuentes en los tejidos afectados con PC, no están asociados de manera directa con la infección inicial, comportándose aparentemente como secundarios en tejidos colonizados previamente por *Phytophthora* sp.

Bibliografía

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th. Edition. Elsevier Academic Press. Oxford. 922 p.
- Albertazzi, H.; Bulgarelli J.; Chinchilla, C. 2005. Onset of Spear Root Symptoms in Oil Palm and Prior (and contemporary) Events. *ASD Oil Palm Papers*: 21-41
- Ayala, L.; Coffey, M. D.; Gómez, P. L. 2000. Caracterización morfológica de aislamientos *Phytiaceos* obtenidos de palmas (*Elaeis guineensis* Jacq.) afectadas por Pudrición del cogollo. *Ceniavances*, Colombia. N° 74. 4 p.
- Bachy, A. 1954. Contributio à l'étude du couer du palmier à huile. *Oléagineux*. 9 (8-9): 619-627.
- Barnett, H. L.; Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. APS Press, St. Paul, Minnesota. 218 p.
- Cenipalma. 1998. Aislamientos y patogenicidad de *Thielaviopsis paradoxa* y otros posibles agentes causales del complejo pudrición del cogollo de la Palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Ceniavances* N° 46. 2 p.
- Chávez, F. 1974. Pudrición del cogollo de la Palma de aceite en Ecuador. Capítulo XII. *Archivo del Departamento de Fitopatología de la Estación Experimental Santo Domingo*. P. 153-170.
- Dzido, J. L.; Genty, P.; Ollagnier, M. 1978. Les principales maladies du palmier à huile en Equateur. *Oléagineux* 33(2): 55-63.
- Duff, A. D. S. 1963. The Bud Rot Little Leaf Disease of the Oil Palm. *J. W. African Institute. Oil Palm Research*. 4(14): 176-190.
- 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). Informe Mimeografiado. 131 p.
- Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora. Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 562 p.
- Franqueville, H. de. 2001. La Pudrición del cogollo de la palma aceitera en América Latina. Revisión preliminar de hechos y logros alcanzados. *Cirad*. 35 p.
- Franqueville, H. de. 2003. *Oil Palm Bud Rot in Latin America*. *Expl. Agric.* 39: 225-240. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Garofalo, J. F.; McMillan, R. T. 1999. *Phytophthora* Bud Rot of Palms in South Florida. *Fact Sheet No. 27 Cooperative Extension Service, IFAS, University of Florida*. 2 p.
- Genty, Ph.; Desmier de Chenon, R.; Morin, J. P. 1978. Las plagas de la palma aceitera en América Latina. *Oleagineux (Francia)* 33 (7): 326-420.
- Gómez C., P. L.; Acosta G., A.; Guevara L., A.; Nieto P., L. E. 1995. Pudrición de cogollo en Colombia: Importancia, investigación y posibilidades de manejo. Estado actual de la investigación sobre la Pudrición de cogollo. *Revista Palmas, Colombia*. Número especial (16): 198-206.
- Martínez, G. 2008. Avances en la solución de la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite en Colombia. *Revista Palmas, Colombia*. 29 (2): 53-64.
- Martínez, G.; Torres, G. A. 2007. Presencia de la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite (PC) en plantas de vivero. *Revista Palmas, Colombia*. 28 (4): 13-20.
- Martínez, G.; Torres, G. A. 2008. Escala de severidad de la Palma de aceite. *Folleto divulgativo. Cenipalma, Colombia*. 12 p.
- Martínez, G.; Sarria, G. A.; Torres, G. A.; Aya, H. A.; Ariza, J. G; Rodríguez, J.; Vélez, D. C.; Varón, F.; Romero, H. M.; Sanz, H. M. 2008a. *Phytophthora* sp., es el responsable de la lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite en Colombia. En las memorias de la VIII Reunión Técnica Nacional de Palma de aceite. *Compensar*, 22 - 24 de septiembre, Bogotá.

- Martínez, G.; Varón, F.; Sarria, G. A.; Torres, G. A.; Aya, H. A.; Ariza, J. G.; Salcedo, S.; Morales, L. 2008b. Opciones para el manejo de la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite en áreas de baja incidencia de la enfermedad. En las memorias de la VIII Reunión Técnica Nacional de Palma de aceite. Compensar, 22 - 24 de septiembre, Bogotá.
- Munévar, F.; Acosta, A. 2002. Recomendaciones de manejo del cultivo de Palma de aceite para minimizar el impacto de la Pudrición del cogollo. Ceniavances, Colombia. 27: 1-4.
- Nieto P., L. E. 1996. Síntomas e identificación del agente causal del complejo Pudrición del cogollo de la Palma de aceite, *Elaeis guineensis* Jacq. Revista Palmas, Colombia. 71(2): 57-60.
- Nieto, L. E. Gómez C., P. L.; Lozano T., C. 1996. Identificación y reproducción del complejo Pudrición del cogollo de la Palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Revista Palmas, Colombia. 17(1): 63-67.
- Ochoa, G. 1974. Investigación del agente causal de la pudrición de flecha en la palma africana. Tesis (Mag. Sc.). Programa Univ. Nacional de Colombia / ICA, Bogotá, Colombia. 144 p.
- Ochoa, G.; Bustamante, E. 1979. Investigación del agente causal de la Pudrición de flecha en Palma africana. Revista ICA, Colombia. 2(4): 425-433.
- Quillec, G. 1983. Etude de la pourriture du coeur de Shushufindi (Equateur). Document Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) 1757, fevrier 1983. pp.47.
- Richardson, D. L. 1995. The History of Oil Palm Breeding in the United Fruit Company, ASD Oil Palm Papers. 11: 1-22.
- Sánchez, N. J.; Álvarez, E.; Gómez, P. L. 1999. Patogenicidad, identificación y caracterización molecular de *Phytophthora* spp., en Palma de aceite. Ceniavances, Colombia. No. 60. 4 p.
- Sarria, G. A.; Torres, G. A.; Aya, H. A.; Ariza, J. G.; Rodríguez, J.; Vélez, D. C.; Varón, F.; Martínez, G. 2008. *Phytophthora* sp., es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite en Colombia. Revista Palmas, Colombia. 29 (3).
- Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3Th. Ed. APS Press. The American Phytopathologica Society. St. Paul Minnesota. 373 p.
- Steer, J.; Coates-Beckford, P. L. 1991. Papel de *Phytophthora katsurae*, *P. palmivora*, *Thielaviopsis paradoxa* y *Enterobacter* sp. en la Pudrición de cogollo de los cocoteros en Jamaica. Revista Palmas, Colombia. 12 (4): 35-45.
- Torres L, G. A. Martínez L, G. 2007. Descripción de síntomas de la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite (*Elaeis guineensis*, Jacq) en palmas de vivero. Memorias del XXVIII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Ascolfi.
- Torres, G. A.; Sarria, G. A.; Salcedo, S.; Varón, F.; Aya, H. A.; Ariza, J. G.; Morales, L.; Martínez, G. 2008a. Opciones de manejo de la Pudrición del cogollo (PC), de la Palma de aceite en áreas de baja incidencia de la enfermedad. Revista Palmas, Colombia. 29 (3).
- Torres, G. A.; Acosta, J. R.; Ariza, J. G.; Aya, H. A.; Roa, M. D.; Vélez, D.C.; Martínez, G. 2008b. Papel de las palmas espontáneas como hospedero alternativo de *Phytophthora* sp., agente causal de la Pudrición del cogollo (PC), de la Palma de aceite en Colombia. Revista Palmas, Colombia. 29 (3).
- Turner, P. D. 1981. Oil Palm Diseases and Disorders. Oxford University Press. Kuala Lumpur. 115 -162.

PAUTA CASA DE CAMPO 1/2 PAGINA NUEVA Vertical