

Phytophthora palmivora es el agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite

Phytophthora palmivora is the casual agent of bud rot in oil palm

AUTORES



Gerardo Martínez
Greicy A. Sarria
Gabriel A. Torres
Francia Varón

Proyecto Sanidad de la Palma,
Cenipalma, Calle 20ª No. 43ª-50
Piso 4. Bogotá, Colombia.
gerardo.martinez@cenipalma.org

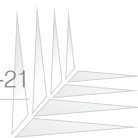
Palabras CLAVE

Pudrición del cogollo (pc),
Phytophthora palmivora,
agente causal, palma de aceite.

Bud Rod, *Phytophthora palmivora*,
causal agent, oil palm

Resumen

La pudrición del cogollo (PC) es una de las enfermedades más limitante para la producción de palma de aceite, no solo en Colombia, sino también en países vecinos. Los estudios orientados a la identificación del agente causal de la misma por casi cincuenta años no habían llevado a resultados concluyentes. En este trabajo se presentan los avances de las investigaciones que permitieron resolver esta incógnita y orientar una serie de actividades para su manejo y control. El aislamiento del *Phytophthora* se logró utilizando como trampa, frutos que fueron inoculados con tejido de palmas que mostraban síntomas en estados tempranos de infección. Se usó el tejido ubicado en el frente de avance de la lesión. Una vez se observó el desarrollo del patógeno en los frutos se pasó a medios selectivos y no selectivos, con o sin antibióticos o fungicidas, para limitar el crecimiento de los hongos y bacterias oportunistas que siempre se presentan en este proceso. Con los cultivos puros obtenidos se realizaron estudios morfológicos y moleculares de *Phytophthora* sp. y pruebas de patogenicidad en palmas de vivero e inoculaciones en condiciones *in vitro* de flechas inmaduras obtenidas a partir de palmas sanas de menos de un año de edad. Los aislamientos de *Phytophthora* presentaron en Agar-avena, micelio de color blanco, deprimido con abundantes esporangios papilados, elipsoides, con pedicelo corto, con un tamaño promedio de 37,1 μm x 52,8 μm . El diámetro promedio de las clamidosporas, que se encontraron frecuentemente en el frente de avance de la infección fue 42,4 μm . El ADN de los aislamientos fue utilizado para amplificación por PCR, mediante los iniciadores ITS 1/ ITS 4. El análisis BLASTn de las secuencias (Accesión No. GQ398157 en el GeneBank) mostró una homología superior al 99,9% con *Phytophthora palmivora*. La patogenicidad de los aislamientos de *P. palmivora* obtenidos se confirmó por inoculación con una suspensión de 40.000 esporangios/ml inyectada en a base de la flecha de 150 palmas de vivero. Los síntomas iniciales de la pc se observaron tres o cuatro días después de la inoculación en 85% de las palmas. De estas el 15% presentaron los síntomas característicos de pudrición en



el corazón de la palma, cogollo, cuando las condiciones ambientales fueron favorables para el desarrollo de la pc. En las inoculaciones *in vitro* en 20 flechas inmaduras, tres días después de la inoculación se produjo en todas ellas, desintegración de los tejidos y un olor característico. La presencia de *P. palmivora* en estos tejidos fue confirmada por observaciones microscópicas y el re-aislamiento del patógeno, utilizando la técnica de captura en frutos. No se observaron síntomas en las plantas que se tuvieron como control. Con el conocimiento del responsable de la enfermedad se han iniciado programas de manejo y control de la enfermedad, que comienzan a presentar resultados muy positivos.

Abstract

Bud rot (PC) is one of the most limiting diseases in the production of oil palm, not only in Colombia but also in neighboring countries. Nearly 50 years of studies aimed at identifying the causal agent of the disease have failed to yield conclusive results. This paper presents the results of the investigations that led to solve this puzzle and guide a series of activities for management and control. The isolation of *Phytophthora* was achieved using traps of fruits inoculated with tissue from palms showing symptoms in early stages of infection. Tissue from the advancing front of the lesion was used. Once pathogen growth was observed in the fruits, the tissues were transferred to selective and nonselective media, with or without antibiotics or fungicides, to restrict the growth of opportunistic bacteria and fungi which are always present in this process. With the pure cultures obtained, we conducted morphological and molecular studies of *Phytophthora* sp. pathogenicity tests on nursery palms and in-vitro inoculations of immature spear leaves from healthy palms of less than one year old. *Phytophthora* isolates on oatmeal agar showed white mycelium, depressed with abundant papillate sporangia, ellipsoid, with short pedicel, with an average size of $37.1 \mu\text{m} \times 52.8 \mu\text{m}$. The average diameter of chlamydospores, which are frequently found in the advancing front of the infection, was $42.4 \mu\text{m}$. The DNA of isolates was used for PCR amplification, using ITS 1 / STS 4 primers. BLASTn analysis of the sequences (Accession No. GQ398157 in GeneBank) showed a homology greater than 99.9% with *Phytophthora palmivora*. The pathogenicity of isolates of *P. palmivora* obtained was confirmed by inoculation with a suspension of 40,000 sporangia / ml injected into the base of the spear of 150 nursery palms. The first symptoms of bud rot (PC) appeared three or four days after inoculation in 85% of the palms. 15% of the palms showed the characteristic symptoms of bud rot when environmental conditions were favorable for the development of the PC. Three days after the *In vitro* inoculations on 20 immature spear leaves, all tissues showed disintegration and the characteristic odor. The presence of *P. palmivora* in these tissues was confirmed by microscopic observations and the re-isolation of the pathogen, using the fruit capture technique. No symptoms were observed in plants used as control. With the causal agent of the disease identified, programs for management and control of the disease have been implemented with positive results.



Introducción

La pudrición del cogollo (PC), de la palma de aceite es uno de los factores más limitantes para el desarrollo del cultivo, no solo en Colombia, sino también en otras zonas palmeras en el trópico americano, donde existen áreas geográficas en las cuales ha sido tan severa que ha causado la pérdida de miles de palmas y efectos económicos y sociales muy graves. Uno de los casos más

conocidos de la PC, es el de Coldesa S.A., en Urabá (De Rojas y Ruiz, 1972; Franqueville, 2001, 2003; Gómez *et al.*, 1995; Martínez, 2008; Ochoa, 1974; Sánchez y Manzano, 1969, citados por Ochoa y Bustamante, 1979; Sarria *et al.*, 2008 a y b; Torres *et al.*, 2008c), pero también existen evidencias de haber afectado las plantaciones del Bajo Calima (Valle del Cauca).

Por los síntomas registrados en otras localidades, la PC ha sido la responsable de graves afecciones en Brasil, Ecuador, Surinam y Panamá y también se ha presentado en Costa Rica, Nicaragua, Perú y Venezuela (Damatta, 1956, citado por van Hoof y Seinhorst, 1962; Franqueville, 2001, 2003; Gómez *et al.*, 1995; Malagutti, 1953, citado por van Hoof y Seinhorst, 1962; Ochoa y Bustamante, 1979; Torres y Martínez, 2007).

Además se encuentran numerosas descripciones de síntomas similares en el tiempo y en el espacio en otras regiones (Bunting *et al.*, 1934, y Bull y Robertson, 1959, citados por Duff, 1963; Donkersloot, 1955, citado por van Hoof y Seinhorst, 1962; Kowachich, 1952, citado por Duff, 1963; Wakefield, 1920, citado por Duff, 1963; Turner, 1970, citado por De Rojas y Ruiz, 1972; Turner, 1981), sugiriendo que esta enfermedad se encuentra presente en todas las zonas en donde se desarrolla este cultivo. Drenth y Sendall (2001), describen la pudrición del cogollo en varias especies de palmas, asociada con *Phytophthora* sp., con síntomas muy similar a los observados en palma de aceite en Colombia.

Los trabajos adelantados por los investigadores de Cenipalma, permitieron detectar procesos tempranos de infección, caracterizar los síntomas y el desarrollo de la enfermedad en el corazón de la palma: su cogollo (Ariza *et al.*, 2008; Aya *et al.*, 2008; Martínez y Torres, 2007; Martínez, 2008; Martínez *et al.*, 2008 a y b; Salcedo *et al.*, 2008; Torres y Martínez, 2007, y Torres *et al.*, 2008 a, b, c).

Las investigaciones realizadas previamente por Cenipalma en Colombia, sugerían que el responsable de la PC era el hongo *Thielaviopsis paradoxa*, existiendo evidencias de un comportamiento diferente entre aislamientos, con distintos grados de virulencia (Nieto, 1996; Nieto *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1999). Otros estudios sobre posibles agentes causales de PC en diferentes especies de palmas, describen entre otros, a microorganismos como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* y bacterias del género *Erwinia* (Ayala *et al.*, 2000; Franqueville, 2001 y 2003; De Rojas y Ruiz, 1972; Garofalo y McMillan, 1999; Genty *et al.*, 1978; Nieto, 1996; Nieto *et al.*, 1996; Ochoa y Bustamante, 1979; Sánchez *et al.*, 1999; Turner, 1981). Todos ellos fueron encontrados nuevamente en los estudios de

identificación de posibles responsables de la PC (Sarria *et al.*, 2008b).

Recientemente el grupo de investigación de Cenipalma identificó y comprobó la patogenicidad de *Phytophthora palmivora* (Martínez *et al.*, 2008 a y b; Sarria *et al.*, 2008c; Torres *et al.*, 2009).

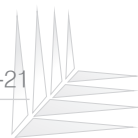
El género *Phytophthora* “el destructor de plantas”, ha sido ampliamente estudiado desde 1876, momento en que De Bary identificó a *P. infestans* como el responsable de la gota de la papa. Las especies de *Phytophthora* son muy diferentes de muchos otros patógenos de plantas, con características morfológicas, genéticas y fisiológicas muy particulares. Su complicado ciclo de vida, con formas muy diferentes, desde sus zoosporas móviles hasta las oosporas de paredes gruesas, hace que el control de estas enfermedades sea un reto difícil de afrontar (Zentmyer, 1983).

Ribeiro (1983), indica que los esporangios se forman tanto en medio líquido como en sólido, según la especie y entre aislamientos de la misma especie. Su formación se ve favorecida en la medida en que se llega a un 100% de humedad relativa y está relacionada con los medios de cultivo que se utilicen.

P. palmivora afecta muchos grupos de plantas y a diferencia de otras especies en el género que son principalmente patógenos del suelo, infecta la parte aérea de las plantas, pero también es un patógeno de raíces. Produce abundantes esporangios en agua y en muchos medios de agar, los cuales no son persistentes (caducos). Las investigaciones sugieren que se trata de una especie originaria de Centro y Suramérica, encontrándose en plantas nativas como cacao, caucho, papaya, aguacate y otras tropicales y subtropicales, de donde ha migrado con sus huéspedes a otras zonas (Drenth y Sendall, 2001; Zentmyer, 1983).

Las enfermedades causadas por especies de *Phytophthora* en varias palmáceas incluyen añublo y muerte de plántulas, pudrición de raíces, corona y tronco, manchas de hojas, pudrición de pecíolos, caída de nueces y frutos, pudrición apical, del cogollo y corazón seguida de la muerte de la planta (Drenth y Sendall, 2001; Elliott *et al.*, 2004; Garofalo y McMillan, 1999).

La pudrición del cogollo por *Phytophthora* es la enfermedad más común encontrada en las palmas que



se desarrollan en climas húmedos tropicales (Garofalo y McMillan, 1999).

Las especies en el género *Phytophthora*, se han venido incrementando en un número cada vez más grande de plantas (Drenth y Sendall, 2001; Gallegly y Hong, 2008; Ko y Chang, 1979; citados por Zentmyer, Newhook *et al.*, 1978 y 1983; Waterhouse, 1970). Según Waterhouse y colaboradores hasta (1983), solo se habían reconocido 43 especies de *Phytophthora*. En 1996 Erwin y Ribeiro llevan este número a 60 especies, y actualmente su número supera las 100 especies (D. Guest, comunicación personal). Algunas de ellas tienen un rango muy limitado de plantas huéspedes, pero otras especies tienen la capacidad de causar infección en muchas especies (Drenth y Sendall, 2001).

La incorporación de herramientas moleculares, tales como los patrones proteínicos electroforéticos, patrones isoenzimáticos (PCR) y métodos de extracción de ADN han facilitado la identificación rápida y acertada de los aislamientos (Erwin y Ribeiro, 1996; Martín y Tooley, 2004; Trout *et al.*, 1997). Estos procedimientos son un complemento al trabajo de diagnóstico fitopatológico de especies de este género, que son las que definitivamente confirman la patogenicidad del microorganismo y su papel en el desarrollo de una enfermedad.

Las estrategias de control de estas enfermedades han estado orientadas a la eliminación de fuentes de inóculo, al tratamiento de las plantas afectadas, la implementación de programas de control químico y la búsqueda de fuentes de resistencia o tolerancia a estos patógenos (Drenth y Guest, 2004; Guest y Grat, 1991; Guest, Morales *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2008c).

En este trabajo se presentan los resultados de las investigaciones realizada por los investigadores de sanidad de la palma, de Cenipalma, sobre *Phytophthora palmivora*, el agente responsable de la PC en la palma de aceite.

Materiales y métodos

A partir de las muestras tomadas en las zonas Palmeras, Occidental y Central de Colombia, se realizaron aislamientos mediante inoculación en diferentes trampas con frutos, según los procedimientos descritos por

Erwin y Ribeiro (1996) y Drenth y Guest (2004), tanto en el laboratorio de Fitopatología de Cenipalma en Tumaco, como en el Centro Experimental el Palmar de la Vizcaína en Barrancabermeja, utilizando tejidos del avance de las lesiones asociadas con PC en los primeros grados de severidad. Luego se procedió a su cultivo en medios selectivos y no selectivos, con o sin antibióticos o fungicidas, para limitar el crecimiento de los hongos y bacterias que con mucha frecuencia se encontraron actuando como oportunistas en las lesiones iniciadas por *Phytophthora*.

Características morfológicas

Para estudiar las características morfológicas que permitieran un acercamiento a la especie, se realizaron observaciones morfológicas del micelio, clamidosporas y esporangios, siguiendo algunos de los parámetros recomendados como forma, tamaño, presencia o no de papila y longitud del pedicelo, recomendadas por Drenth y Sendall (2001); Erwin y Ribeiro (1996). En el caso de los esporangios se midió el largo y el ancho y en las clamidosporas el diámetro. Además se verificó si se presentaba desprendimiento de los esporangios.

Caracterización molecular

Para la identificación molecular, los aislamientos de *Phytophthora* obtenidos en los trabajos de diagnóstico realizados por Cenipalma, se crecieron en medio líquido. Con la ayuda de un asa se tomó crecimiento micelial, se depositó en caldo papa-dextrosa y se dejó durante cuatro días en condiciones de oscuridad en un deshumidificador a 28 °C. Posteriormente, el crecimiento micelial se depositó en tubos Falcon estériles, adicionándoles 1,5 ml de solución de lisis de Qyagen, de acuerdo con la metodología sugerida por Mónica Elliott, 2008 (datos no publicados).

Las muestras fueron enviadas en lisis, desde Colombia al laboratorio de la doctora Elliott en el Fort Lauderdale, Research and Educational Center, de la Universidad de la Florida (Estados Unidos). Se procedió a cambiar el material de los tubos enviados a microtubos de 1,5 ml, previamente marcados. Estos se incubaron durante una hora al baño María a una temperatura de 65 °C, agitándolos cada 15 minutos para favorecer la lisis, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente.

Luego se procedió a centrifugarlo a 14.000 RPM durante 15 minutos. El sobrenadante de cada tubo se pasó a un nuevo tubo, a los que se le adicionó 200 μ l de solución para la precipitación de proteínas y se les sometió a agitación (Vortex) por 10 segundos. Los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 14.000 RPM y se recuperó de cada tubo el sobrenadante, transfiriéndolo a un nuevo microtubo de 1,5 ml premarcado. Se adicionó isopropanol al 100%, se agitó manualmente para garantizar la mezcla y se almacenó a -20 °C durante la noche.

Los tubos fueron sacados del congelador y centrifugados a 14.000 RPM durante 10 minutos; cuidadosamente fue descartado el sobrenadante y se colocaron a secar sobre papel absorbente. A cada tubo seco se le adicionó 1 ml de etanol frío para remover las sales y se agitó para que entraran en solución, luego se centrifugó a 14.000 RPM por tres minutos y se retiró cuidadosamente el etanol, evitando remover el precipitado. Los tubos se dejaron secar por 15 minutos.

Se procedió a la hidratación del ADN, adicionando 40 μ l de agua pura estéril, incubando los tubos a 65 °C por dos minutos, sometiéndolos luego a agitación (Vortex) por 1 minuto y recuperando los sobrenadantes en nuevos tubos que se almacenaron a 4 °C, hasta ser usados.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés), se tomaron 45 μ l del cóctel que incluye los iniciadores y las enzimas necesarias (Tabla 1). En seguida, se depositaron en los microtubos específicos para el termociclador, adicionándoles 5 μ l del ADN obtenido de cada una de las muestras. Los preparados se sometieron a agitación (Vortex) para garantizar su mezcla y luego a centrifugación

muy breve para evitar gotas en las paredes de los microtubos. Luego se colocaron en un termociclador MJ, usando el siguiente programa: (1) Un ciclo de 9 minutos a 95 °C; (2) Un ciclo de 1 minuto a 94 °C; (3) Un ciclo de 1 minuto a 52 °C; (4) Un ciclo de 1 minuto a 72 °C; (5) 34 ciclos repitiendo los pasos del 2 al 4; (6) Un ciclo de 10 minutos a 72°; (7) Se dejó a 4 °C indefinidamente hasta su uso.

Las muestras se corrieron en electroforesis usando un gel preparado con 1,5 gr de agarosa para electroforesis por cada 100 ml de tampón 1XTAE. Se elaboró un gel con 20 casillas. Las muestras fueron cargadas en seco, es decir se montaron antes de adicionar la solución tampón de carga (1XTAE). En las casillas de los extremos (derecho e izquierdo) que se utilizan para los patrones de peso molecular, se depositaron 20 μ l de la mezcla compuesta por 1,2 μ l 1 Kb plus Ladder, 6 μ l de solución colorante Blue-orange 6X y 32,8 μ l de 1XTAE.

La bandeja de electroforesis se llenó con solución tampón de carga hasta cubrir ligeramente el gel, se tapó y se corrió a 65 voltios por dos horas. Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó durante cinco minutos en una bandeja con bromuro de etidio en una solución de 1 μ l del reactivo/ 1 ml de la solución. Luego se lavó tres veces con agua desionizada y se dejó en una bandeja con agua por diez minutos para destañir y se lavó dos veces más previo a la fotografía realizada en un equipo UV.

Se procedió a purificar y cuantificar los productos del PCR. Utilizando el kit Promega Wizard PCR Clean-up Prep. Los productos purificados, fueron enviados al laboratorio de secuenciación de la Universidad de la Florida en Gainesville y la secuencia obtenida fue reeditada en la Universidad de California.

Otras muestras se han procesado directamente en el laboratorio de Biología Molecular de Cenipalma en el Centro Experimental Palmar de la Vizcaína, siguiendo el mismo protocolo general y realizando la secuenciación en convenio con MacroGen en Corea del Sur.

Pruebas de patogenicidad

Para la visualización de estructuras de los microorganismos presentes en los tejidos enfermos de palmas en las inoculadas en las pruebas de patogenicidad, se tomaron muestras de la zona de avance de la lesión,

Tabla 1. Componentes de la mezcla estándar para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cantidad	Componente
10 μ l	5x ProMega Green GoTaq amplification (reaction) buffer
5 μ l	10x dNTP
5 μ l	Iniciador 1 (ITS 1)
5 μ l	Iniciador 2 (ITS 4)
19,75 μ l	Agua pura
0,25 μ l	Taq Polimerasa

en los primeros grados de severidad de la PC, se realizó decoloración con hidróxido de potasio o hipoclorito de sodio y algunas veces tinción con diferentes colorantes (azul de metileno, azul de Toluidina y Luxol verde brillante), siguiendo las recomendaciones que se encuentran en diferentes textos de fitopatología (Agrios, 2005; Ritchie, 2002). En las pruebas de patogenicidad de las inoculaciones in vitro se realizó la observación al microscopio sin decoloración ni tinción.

Manejo y control

Con el conocimiento del agente causante de la enfermedad se han implementado una serie de estrategias que incluyen diagnóstico temprano, eliminación del tejido enfermo de las plantas afectadas en los primeros estados de desarrollo de la enfermedad, y erradicación de palmas en estados avanzados y programas de renovación temprana de lotes muy afectados, utilizando para las nuevas siembras materiales tolerantes a la enfermedad.

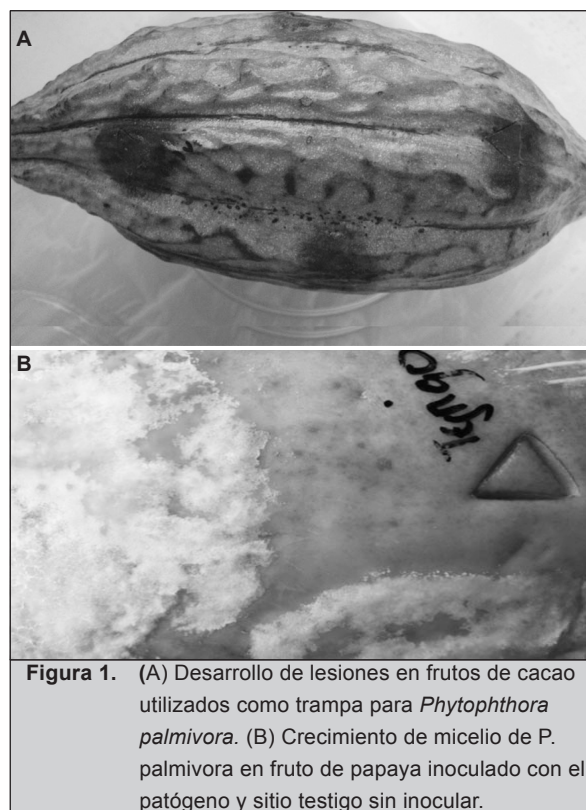
Resultados

Aislamiento del patógeno

El aislamiento del patógeno se logró inoculando frutos de cacao como trampa para la captura del patógeno, obteniendo en 24-48 horas el desarrollo de una lesión necrótica característica (Figura 1a). En las inoculaciones en papaya se observó abundante crecimiento micelial de apariencia algodonosa, alrededor del sitio de la inoculación (Figura 1b). Otros frutos en los cuales se obtuvo un crecimiento satisfactorio fueron peras, manzanas y pomarrosa de Málaga.

Los mejores tejidos para realizar el aislamiento fueron los del frente de avance de las lesiones en palmas en los primeros estados de desarrollo de la PC (Figura 2), como lo registran Drenth y Sendall (2001).

Durante el proceso de cultivo en los medios selectivos y no selectivos se presentaron frecuentemente contaminaciones con varios de los diferentes hongos y bacterias, situación que siempre han encontrado los fitopatólogos cuando tratan de aislar *Phytophthora*, los cuales han sido previamente registrados como oportunistas (Drenth y Sendall, 2001; Sarria *et al.* 2008a), pero finalmente se logró la obtención de cultivos puros.



Características morfológicas de *Phytophthora sp.*

El patógeno aislado y purificado se caracterizó por presentar micelio cenocítico (no septado), de color blanco y de crecimiento deprimido, en medio de cultivo agar avena. Con frecuencia el micelio se mostró hinchado y nudoso cuando se reprodujo en agar pera o en frutos de pimentón. En todos los medios de cultivo y aislamientos de *Phytophthora*, el micelio fue delgado y delicado con consistencia acuosa, situación que hizo más difícil su aislamiento y recuperación, pero permitió diferenciarlo de otros microorganismos.

Los esporangios obtenidos en los diferentes medios de cultivo y en los frutos utilizados para promover la esporulación presentaron valores que variaron entre 25 - 50 μm de ancho X 37,5 - 62,5 μm de largo, con promedios de 37,12 X 52,8 μm y una relación largo-ancho de 1,4 (Tabla 2). Los esporangios fueron de diferentes formas pero predominaron los ovoides, esféricos y elipsoides, fueron caducos y papilados con pedicelo corto (Figura, 3) (Sarria *et al.*, 2008a; Torres *et al.*, 2009). Estas observaciones coinciden con las obtenidas por Erwin y Ribeiro (1996); Gallegly y Hong (2008), para la especie *P. palmivora*.

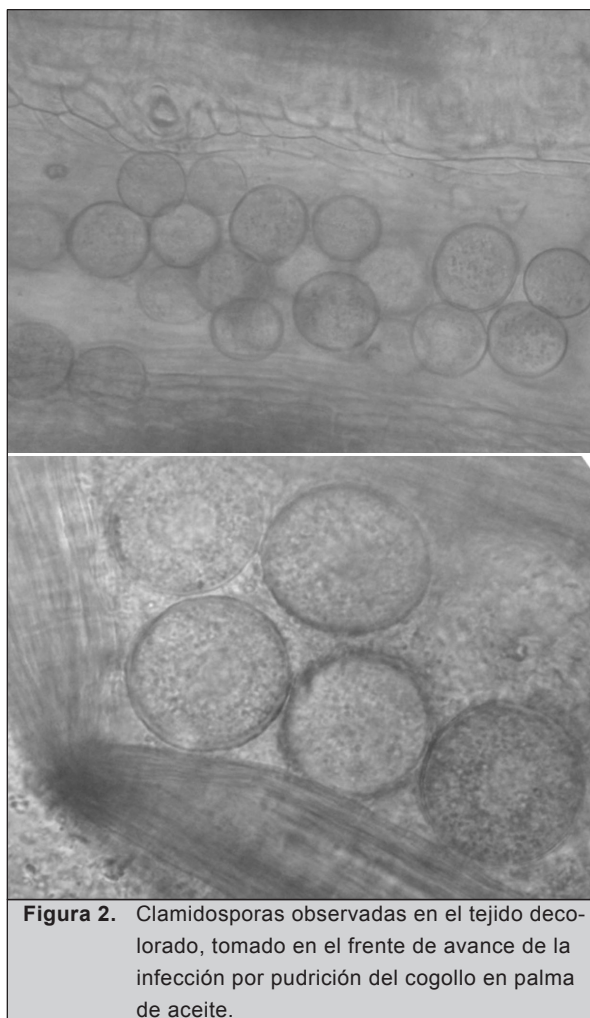


Figura 2. Clamidosporas observadas en el tejido decolorado, tomado en el frente de avance de la infección por pudrición del cogollo en palma de aceite.

Se observaron las dos formas de germinación de los esporangios descritas por Ribeiro (1983): La primera, germinación directa con el desarrollo en un tubo germinativo que eventualmente creció para formar micelio. La segunda, germinación indirecta, con diferenciación de citoplasma en el esporangio para dar origen a las zoosporas, que se observaron luchando por conseguir el turno para acceder al poro de salida y además presentaron gran motilidad tanto en el interior del esporangio como en el exterior, una vez salieron de este.

Se observaron clamidosporas terminales e intercalares con un diámetro que varió entre 35 y 50 μm y un promedio de 42,4 μm (Tabla 2), que difiere de los registros de Erwin y Ribeiro (1996), quienes indican un rango de 30 a 45 μm para *P. palmivora* y del promedio de 33 μm que registran Gallegly y Hong (2008).

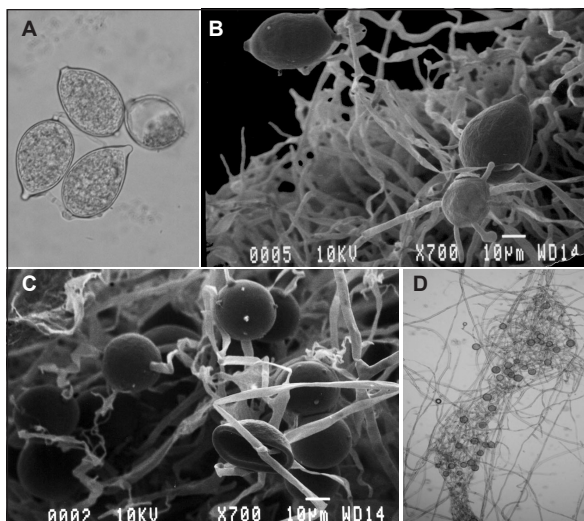


Figura 3. (A). Microscopía de luz de esporangios papilados, elipsoides con pedicelo corto, característicos de *Phytophthora palmivora*. (B). Microscopía electrónica de esporangios y micelio de *P. palmivora*. (C). Microscopía electrónica de clamidosporas y micelio de *P. palmivora*. (D). Microscopía de luz de Clamidosporas y micelio de *Phytophthora palmivora*.

Tabla 2. Morfología de las estructuras de *Phytophthora palmivora* agente causal de las lesiones iniciales de PC en Palma de aceite

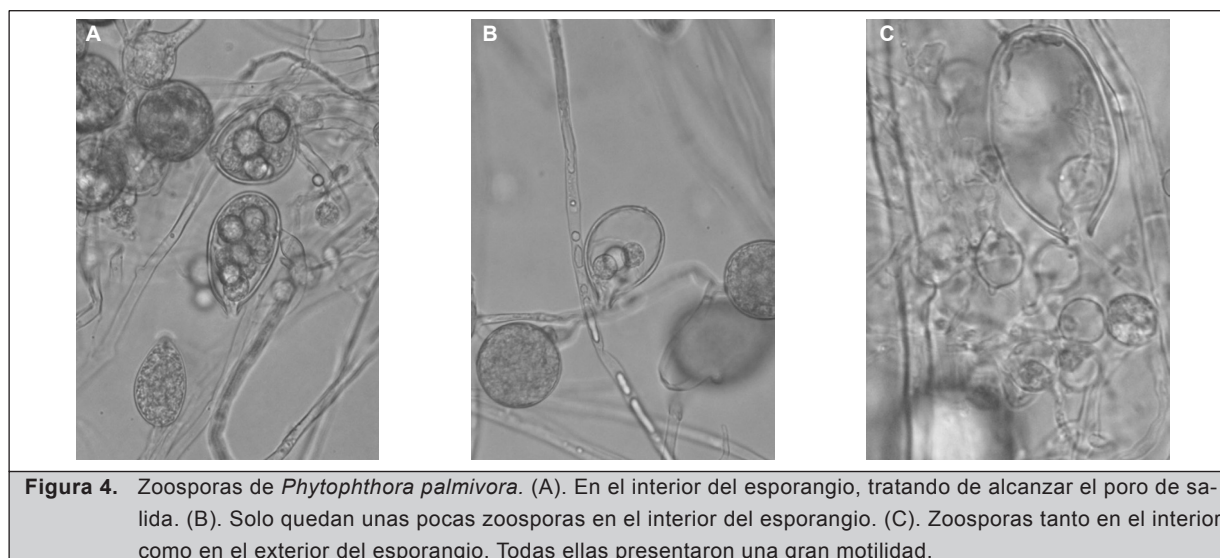
	Clamidosporas	Esporangios	
	Diámetro*	Largo*	Ancho*
Promedio	42,4	52,8	37,1
Mínimo	35,0	37,5	25,0
Máximo	50,0	62,5	50,0

* Promedio de 100 repeticiones, medidos en μm .

Caracterización molecular

En el gel se amplificó una banda cercana a los 900 pb, correspondiente a *Phytophthora palmivora* (Figura 4). Los valores en este rango son característicos de género *Phytophthora* (Chowdappa *et al.*, 2003). Resultados similares se obtuvieron con aislamientos de las zonas Central y Oriental. Caracterizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Cenipalma en el Centro Experimental Palmar de la Vizcaína.

Las secuencias se editaron utilizando el software BioEdit version 5.0.6, y se compararon con los registros del NCBI-BLASTn (Accesión No. GQ398157 en el GenBank) mostró en el primer aislamiento obtenido en Tumaco, una homología superior al 99,9% con *Phyto-*



phthora palmivora. Los otros aislamientos obtenidos con las características morfológicas de *P. palmivora* fueron también confirmados por biología molecular y secuenciados por MacroGen, en Corea del Sur.

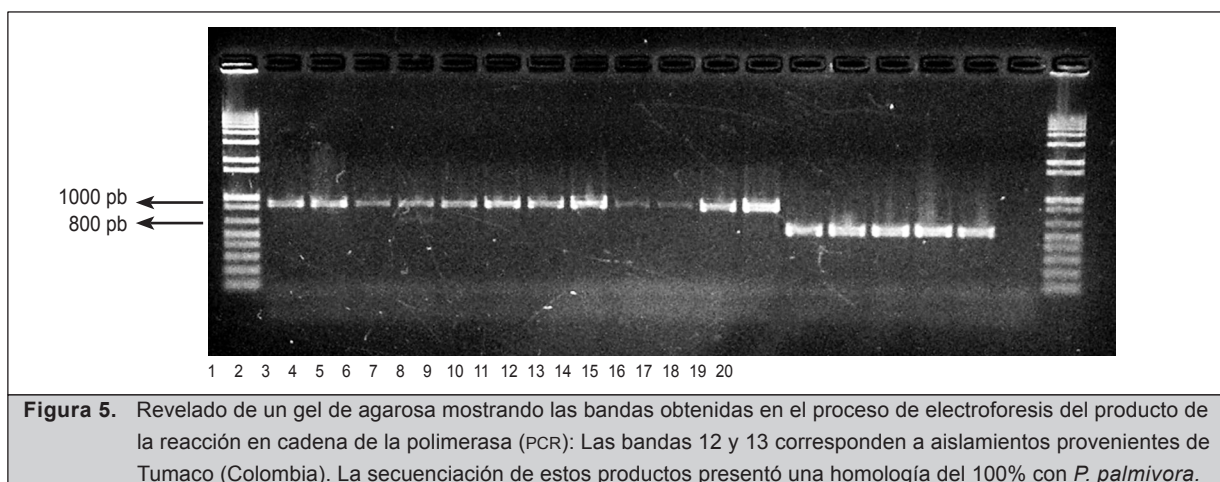
Pruebas de patogenicidad

En las 150 palmas de vivero inoculadas, se presentaron los síntomas iniciales de la PC, 3-4 días después en el 85% de ellas, pero el desarrollo de los síntomas hacia estados avanzados de PC estuvieron fuertemente influenciados por las condiciones ambientales prevalentes después de la inoculación y estos solo se presentaron en el 15% de las palmas inoculadas.

En las observaciones microscópicas del tejido necrosado como resultado de las inoculaciones en palmas de vivero, sometidos a decoloración y en algunos casos a

tinción, se encontraron estructuras globosas de pared delgada similares a las clamidosporas registradas para *Phytophthora* spp. Estas estructuras han sido registradas en diversos documentos (Agrios, 2005; Drenth y Guest, 2004; Gallegly y Hong, 2008; Jeffers, 2006; Sarria *et al.*, 2008c).

En las pruebas de inoculación de 20 flechas inmaduras en condiciones *in vitro*, se desarrollaron síntomas de la enfermedad en el 100% de los casos, con un olor característico de dos a tres después de la inoculación, en la parte más tierna de las flechas. En el ápice de ellas, con tejidos más maduros no se desarrolló el proceso de infección. Al observar estos tejidos al microscopio, sin decoloración y sin tinción, se identificaron abundantes esporangios característicos de *Phytophthora palmivora* (Figura 5).



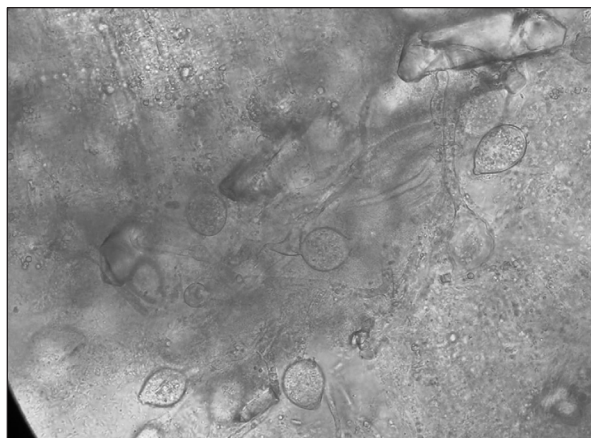


Figura 6 Presencia de esporangios de *Phytophthora palmivora*, tres a cuatro días después de la inoculación en flechas inmaduras en condiciones in vitro. El tejido se ha desintegrado completamente y se presenta un olor característico.

El patógeno fue reaislado de estos tejidos utilizando la técnica de aislamiento de *Phytophthora palmivora* con el uso de trampas de frutos. En ninguna de las inoculaciones realizadas con agua destilada estéril como control, se desarrollaron síntomas de la PC.

Manejo y control

Los trabajos que se vienen realizando para el control de *Phytophthora palmivora* en palma de aceite en varias zonas productoras en Colombia, han comenzado a mostrar resultados muy alentadores, especialmente cuando esta labor se realiza correctamente en los primeros estados de desarrollo de la enfermedad, en lotes con baja incidencia. A medida que se incrementan los

casos en algunos lotes, la presión del inóculo en el área se ha convertido en un factor difícil de controlar, especialmente si los casos se están presentando en épocas con mayores precipitaciones, que facilitan el proceso de reinfecciones por el patógeno.

Discusión

Los avances en las investigaciones desarrolladas por los investigadores de Cenipalma, logrando la identificación del agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia son un paso muy importante para la implementación de estrategias de manejo y control de la enfermedad. El conocimiento del responsable de la enfermedad permite la implementación de medidas más dirigidas, que no se habían podido realizar en el pasado precisamente por las dificultades para alcanzar.

Conclusiones

Las características morfológicas y moleculares observadas durante el desarrollo de este estudio permiten concluir que los aislamientos procedentes de plantas de Palma de aceite afectadas por pudrición del cogollo y cuya patogenicidad fue comprobada en condiciones controladas, corresponden a *Phytophthora palmivora*.

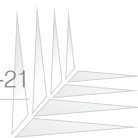
Los microorganismos oportunistas identificados en muchos de los trabajos de investigación, han sido uno de los principales limitantes para aislar el verdadero patógeno.

Phytophthora palmivora debe ser aislado de tejidos en los primeros estados de desarrollo de la enfermedad.



Bibliografía

- Agrios, GN. 2005. Plant Pathology 5th ed. Elsevier Academia Press. Oxford: 922 p.
- Ariza, JG.; Torres, GA.; Sarria, GA.; Varón, F.; Martínez, G. 2008. Relación entre los síntomas externos y el avance interno de la lesión causada por la pudrición del cogollo (PC) en Palmas de vivero en Tumaco. *Fitopatología Colombiana*. 32 (2): 35-38.
- Aya, HA.; Noreña, C.; Torres, GA.; Sarria, GA.; Varón, F.; Martínez, G. 2008. Comportamiento de cuatro materiales de palma de aceite frente a la pudrición del cogollo (PC), en Tumaco-Nariño. *Fitopatología Colombiana*. 32 (2): 51-55.
- Ayala, L.; Coffey, MD.; Gómez, PL. 2000. Caracterización morfológica de aislamientos Phytiaceos obtenidos de palmas (*Elaeis guineensis* Jacq.) afectadas por pudrición del cogollo. *Cenivances* (Colombia). (74) 4 p.
- Chowdappa, P.; Brayford, D.; Smith, J.; Flood, J. 2003. Molecular discrimination of *Phytophthora* isolates on cocoa and their relationship with coconut, black pepper and bell pepper isolates based on rDNA repeat and AFLP fingerprints. *Current Science*. 84 (9): 1235-1238.
- Drenth, A.; Guest, DI., 2004. Diversity and management of *Phytophthora* in Southeast Asia. *Acia Monograph*. Melbourne. (114): 238 p.



- Drenth, A.; Sendall, B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection. Australian Center for International Agricultural Research (Aciar). Brisbane (Australia). 41 pp.
- Duff, A., DS. 1963. The Bud rot little leaf disease of the oil palm. J. W. African Institute. *Oil palm research*. 4 (14): 176-190.
- De Rojas, PE.; Ruiz, BE. 1972. Investigaciones sobre la Pudrición del cogollo-Pudrición de la flecha de la palma africana de la plantación La Arenosa, de Colsa SA. (Turbo, Antioquia). Informe mimeografiado. 131 p.
- Elliott, ML.; Broschat, TK.; Uchida, JY; Simone, GW. 2004. Compendium of Palm Diseases and Disorders. APS: 69 p.
- Erwin, DC.; Ribeiro, OK. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. *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 (Reino Unido).
- Gallegly, ME.; Hong, C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press. St Paul, Minnesota: 158 p.
- Garofalo, JF.; McMillan, RT. 1999. *Phytophthora* bud rot of palms in South Florida. Fact Sheet, Cooperative Extension Service, IFAS, University of Florida. (27): 2 p.
- Gómez C., PL.; Acosta G., A.; Guevara L., A.; Nieto P., LE. 1995. pudrición del cogollo en Colombia: importancia, investigación y posibilidades de manejo. Estado actual de la investigación sobre la Pudrición del cogollo. *Palmas* (Colombia). Número especial (16): 198-206.
- Jeffers, SN. 2006. Identifying Species of *Phytophthora* - Department of Entomology, Soils y Plant Sciences Clemson University-Clemson, sc. 8 p.
- Martín, FN.; Tooley, PW. 2004. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of a polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology*. 94 (9): 983-991.
- Martínez, G. 2008. Avances en la solución de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* (Colombia). 29 (2): 53-64.
- Martínez, G.; Sarria, GA.; Torres, GA.; Aya, HA.; Ariza, JG.; Rodríguez, J.; Vélez, DC.; Varón, F.; Romero, HM.; Sanz, HM. 2008a. *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. En: Memorias de la VIII Reunión técnica nacional de palma de aceite. Bogotá: Compensar, 22 - 24 de septiembre.
- Martínez, G.; Varón, F.; Sarria, GA.; Torres, GA.; Aya, HA.; Ariza, JG.; 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: Memorias de la VIII Reunión técnica nacional de palma de aceite. Bogotá: Compensar, 22 - 24 de septiembre.
- Morales, LC.; Sarria, GA.; Torres, GA.; Varón, F.; Martínez, G. 2008. Experiencias en el manejo integrado de la pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite, en la Zona Central Colombiana. *Fitopatología Colombiana*. 32 (2): 56-61.
- Nieto P., LE. 1996. Síntomas e identificación del agente causal del complejo pudrición del cogollo de la palma de aceite, *Elaeis guineensis* Jacq. *Palmas* (Colombia). 71 (2): 57-60.
- Nieto, LE.; Gómez C., PL.; Lozano T., C. 1996. Identificación y reproducción del complejo pudrición del cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *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 Universidad 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.
- Ribeiro, O.K. 1983, Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. En: Erwin, DC.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, PH. (eds.). *Phytophthora*. Its biology, taxonomy, ecology and pathology. *The American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota (Estados Unidos): 55-70.
- Ritchie, BJ. 2002. Mycological media and methods. En: *Plant Pathologist's pocketbook*. Ed. Walker, JM.; Lenné, JM. 3rd. ed. CABI. Wallingford: 410-431.
- Sánchez, NJ.; Álvarez, E.; Gómez, PL. 1999. Patogenicidad, identificación y caracterización molecular de *Phytophthora* sp. en palma de aceite. *Cenivances* (Colombia) (60) 4 p.
- Sarria, GA.; Torres, GA.; Vélez, DC.; Rodríguez, J.; Noreña, C.; Varón, F.; Coffey, M.; Elliot, M.; Martínez, G. 2008a. 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, GA.; Torres, GA.; Aya, HA.; Ariza, JG.; Rodríguez, J.; Vélez, DC.; Varón, F.; Martínez, G. 2008b. Microorganismos asociados a la pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite y su inoculación en palmas de vivero. *Palmas* (Colombia). 29 (3): 19-29.
- Sarria, G.; Torres, G.; Aya, H.; Ariza, J.; Rodríguez, J.; Vélez, D.; Varón, F.; Martínez, G. 2008c. *Phytophthora* sp., es el responsable de las lesiones iniciales de pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* (Colombia). 29 (3): 31-41.
- Torres, G.A.; Sarria, G.A.; Varón, F.; Coffey, M.D.; Elliott, M.L.; Martínez, G. 2009. First report of bud rot caused by *Phytophthora palmivora* on African oil palm (*Elaeis guineensis*), in Colombia. *Plant Disease* (en impresión).
- Torres, GA.; Acosta, JR.; Ariza, JG.; Aya, HA.; Roa, MD.; Vélez, DC.; Martínez, G. 2008a. Papel de las palmas espontáneas como hospedero alterno de *Phytophthora* sp., agente causal de la pudrición del cogollo (PC), de la palma de aceite en Colombia. *Palmas* (Colombia). 29 (3): 45-52.
- Torres, GA.; Sarria, GA.; Varón, F.; Martínez, G. 2008b. Evidencias circunstanciales de la asociación de especies de la familia. Tettigoniidae con el desarrollo de lesiones iniciales de la pudrición del cogollo de la palma de aceite. *Palmas* (Colombia). 29 (3): 53-61.
- Torres, GA.; Sarria, GA.; Salcedo, S.; Varón, F.; Aya, HA.; Ariza, JG.; Morales, L.; Martínez, G. 2008c. Opciones para el manejo de la pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en áreas de baja

- incidencia de la enfermedad. Palmas (Colombia). 29 (3): 63-72.
- Torres y Martínez, 2007.
- Trout, C-L.; Ristaino, JB.; Madritch, M.; Wangsomboondee, T. 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. *Plant Disease*. 81 (9): 1042-1048.
- Turner, PD. 1981. Oil palm diseases and disorders. Oxford University Press. Kuala Lumpur: 145-162.
- Van Hoof, HA.; Seinhorst, JW. 1962. *Rhadinaphielechus cocophilus* associated with little leaf of coconut and oil palm. *T.Pl.-Ziekten*. 68: 251-256.
- Vélez, DC.; Noreña, C.; Sarria, GA.; Torres, GA.; Varón, F.; Martínez, G. 2008. Evaluación y cuantificación de estructuras de *Phytophthora palmivora* el responsable de la pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite. *Fitopatología Colombiana*. 32 (2): 45-50.
- Zentmyer, GA. 1983. The World of *Phytophthora*. En: Erwin, DC.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, PH. (eds.). *Phytophthora*. Its biology, taxonomy, ecology and pathology. *The American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota (Estados Unidos): 1-7.