

# Ganoderma en la palma de aceite:

Hipótesis sobre infección natural e implementación de una prueba de inoculación artificial para la detección temprana del nivel de resistencia de progenies de palma de aceite

## *Ganoderma disease of the oil palm:*

Hypothesis on natural infection and implementation of an early artificial inoculation test to screen oil palm progenies for their level of resistance

### AUTORES



**H. De Franqueville:**

Cirad Oil Palm Breeding

hubert.de\_franqueville@cirad.fr

**F. Breton; A. Fflori;**

**R. Miranti; S. Umi;**

**S.P.C. Nelson**

PT PP London Sumatra Indonesia

TBK, Sumatra Bioscience, Jl. Jend.

A Yani No. 2, P.O. Box 1154, Medan

20111, Indonesia.

**Z. Lubis; Z. Hayun;**

**PT Socfin;**

Indonesia, Jl. K.L. Yos Sudarso

No. 106, P.O. Box 1254, Medan

20115, Indonesia.

**T. Duran-Gasselín, J.C.**

**Jacquemard,**

Cirad Oil Palm Breeding, Scientific

and Technical Adviser to PT Socfin

Indonesia

### Palabras CLAVE

*Elaeis guineensis*, *Ganoderma*, pudrición basal del tallo, palma de aceite, prueba de detección temprana, mejoramiento para resistencia

*Elaeis guineensis*, *Ganoderma*, basal stem rot, oil palm, early detection test, breeding for resistance, artificial inoculation

## Resumen

La resistencia genética a la pudrición basal del tallo (PBT) de la palma de aceite es un componente importante de una estrategia de control integrado de la enfermedad. La detección temprana del nivel de resistencia o susceptibilidad es fundamental para un programa de mejoramiento y para la sostenibilidad de este cultivo, particularmente en el Sureste Asiático. Una prueba de detección para progenies de palma de aceite se ha desarrollado y validado utilizando material de siembra de dos compañías privadas de Indonesia –PT PP London Sumatra Indonesia (Lonsum) y PT Socfin Indonesia (Socfindo)–. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecieron entre 8 y 10 semanas después de la inoculación de las semillas germinadas. Los análisis para cada cruce probado mostraron correlación positiva entre 16 y 28 semanas, indicando que la detección temprana es realista y que existe una interacción mínima de la susceptibilidad a la enfermedad con el tiempo. El objetivo principal de este documento es resaltar la eficiencia y la reproducibilidad de esta prueba temprana de inoculación previvero que permite detectar ahora aproximadamente 100 progenies por mes.

## Abstract

Genetic resistance to basal stem rot (BSR) of oil palm is an important component of an integrated disease control strategy. Early detection of susceptibility or resistance level is essential for a breeding program and for the sustainability of this crop, particularly in Southeast Asia. A screening test for oil palm progenies was developed and validated using planting material from two private companies in Indonesia, PT PP London Sumatra Indonesia (Lonsum) and PT Socfin Indonesia (Socfindo). The first symptoms

of the disease appeared between 8 and 10 weeks after inoculation of germinated seeds. The analysis of the crosses tested showed a positive correlation between 16 and 28 weeks, indicating that early detection is realistic and that there is minimal interaction of the susceptibility to the disease over time. The main objective of this paper is to highlight the efficiency and reproducibility of this early pre-nursery inoculation test to detect approximately 100 progenies per month.



## Introducción

El cultivo de la palma de aceite está expuesto a amenazas parasíticas en las principales zonas productoras. En Latinoamérica, las enfermedades de pudrición del cogollo son prevalentes (de Franqueville, 2003) y recientes hallazgos sobre el papel de *Phytophthora palmivora* son promisorios en términos de investigación y manejo de la enfermedad (Martinez *et al.*, 2008; Sarria *et al.*, 2008). En África, la enfermedad más importante es el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* (de Franqueville y Diabaté, 1995, 2004; Flood, 2006). En el Sureste Asiático, que es hoy día la principal zona productora, la pudrición basal del tallo (PBT) causada por *Ganoderma boninense* produce daños considerables en el norte de Sumatra (Indonesia) y en muchas partes de la península de Malasia. La PBT también se ha observado en África y en Latinoamérica, pero con menor incidencia. Con base en observaciones de campo, este documento propone una hipótesis sobre el modo de infección natural de las palmas. Por esta razón, se divide en dos partes: una vía posible de infección natural, e implementación de una prueba de inoculación para la detección temprana de resistencia a PBT de las progenies.

## Posible vía de infección natural

Los daños causados por la enfermedad aumentan después de la resiembra y son cada vez más drásticos con el paso de ciclos sucesivos de resiembra (Singh, 1991; Ariffin e Idris, 2002). *Ganoderma boninense* es considerado principalmente un patógeno transmitido por el contacto de las raíces con el suelo. El papel de las basidiosporas en el proceso de infección no es claro, aun si la diversidad genética se puede asociar a este

estado del ciclo de vida del hongo. Hasta el momento no se ha reportado infección natural o artificial que involucre únicamente basidiosporas como fuente de inóculo. Por tanto, parece que la vía de infección del patógeno por medio de la raíz juega un papel importante en la propagación de la PBT en las plantaciones, y casi con seguridad la progresión del hongo en estas raíces conduce a la enfermedad.

Breton *et al.* (2005a), investigando y configurando los mejores parámetros para inducir rápidamente los síntomas mediante inoculación artificial, demostraron que los bloques de madera de caucho inoculados con *Ganoderma* desarrollaron en la superficie una extensa masa de hongos, altamente melanizada. Este tejido fúngico es extremadamente fuerte y forma una estructura estromática, o seudo-esclerocios, en la fuente del inóculo. El uso de un rizotron (o cámara de vidrio) para monitorear el proceso de infección *in vivo* de las plántulas de palma de aceite, demostró que el desarrollo de estas estructuras estromáticas melanizadas por el *Ganoderma* se podían observar únicamente en sustrato sólido, como bloques de madera de caucho (Breton *et al.* 2005b). Usando aserrín de caucho pre-infectado no se produjeron estructuras estromáticas; por tanto, no se presentó la infección. Más aún, la inoculación artificial de plántulas utilizando bloques de madera de caucho, cuyas estructuras estromáticas habían sido eliminadas previamente, demostró la necesidad de esta estructura para inducir una infección rápida (datos no publicados). ¿Cuál puede ser la hipótesis que relaciona los resultados de la infección artificial (pre-vivero) involucrando un papel importante de esta estructura con las observaciones en infecciones naturales de palmas maduras? Se exploró la presencia y la localización de esta estructura estromática en



infecciones naturales en plantaciones de palma de aceite. Independientemente del continente, la edad de la palma o su estado sanitario, siempre se observa la presencia de una hendidura o cavidad basal natural en forma de estrella, de la cual se hicieron observaciones al azar, para determinar si juega un papel en la infección de la palma de aceite.

## Prueba de inoculación para la detección temprana de resistencia de las progenies a la PBT

La detección de resistencia a la marchitez vascular en África, basada en inoculaciones artificiales de *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*, comenzó en los años sesenta en la fase de vivero, y luego en la fase previvero en la década de los setenta (Renard *et al.*, 1980) y demostró ser altamente eficiente para controlar la enfermedad (de Franqueville y Renard, 1990). Flood (2006) anota que se han reportado reducciones dramáticas en pérdidas debidas a esta enfermedad con la introducción de materiales resistentes. Para la PBT, Corley y Tinker (2003) consideran que el mejor enfoque para controlar la enfermedad a largo plazo puede ser el desarrollo de material tolerante usando inoculación en el vivero para detección, en la misma forma en que se ha hecho para el marchitamiento causado por *Fusarium*.

Sin embargo, y a pesar de algunas observaciones obsoletas (Akbar *et al.*, 1971) de que las variaciones en susceptibilidad a PBT podrían ser detectadas a partir de algunas de las principales colecciones de genes, muy poca atención se les había prestado a los aspectos genéticos de control integrado. Las fuentes de resistencia y susceptibilidad se encontraron en ensayos de campo implementados en Socfindo en el norte de Sumatra (de Franqueville *et al.*, 2001; Durand-Gasselin *et al.*, 2005). Las observaciones de campo han demostrado ser consistentes, dada la genética y los diseños estadísticos que sirvieron de base para los ensayos. Estos resultados abrieron el camino para usar recursos genéticos disponibles para mejorar el nivel de resistencia en el material de siembra propuesto a los cultivadores de palma de aceite en áreas con riesgo de PBT.

El proceso de mejoramiento genético, desde luego, toma mucho tiempo para desarrollar si se basa únicamente en ensayos de campo. Por tanto, para poder distinguir rápidamente entre fuentes de susceptibilidad y resistencia a la enfermedad, es importante desarrollar una prueba de detección temprana que involucre la inoculación artificial del patógeno. Fue esta hipótesis la que condujo a la colaboración de Cirad con dos compañías, Socfindo y Lonsum, para elaborar una prueba de detección temprana para mejorar la resistencia a la PBT.

Debido a la naturaleza y variabilidad del patógeno (Miller *et al.*, 1999; Pilotti *et al.*, 2002), desarrollar dicha herramienta es un proceso complejo. Sin embargo, Breton *et al.* (2005a, 2006) caracterizaron y estandarizaron varios parámetros importantes para el éxito de una prueba de detección temprana (inoculación artificial). Estos parámetros incluyen el estado fisiológico del material de siembra, sombra del vivero, temperatura, tiempo de incubación y tamaño de la fuente de inóculo, la mayoría de ellos confirmados por Rees *et al.* (2007). El método de inoculación de semillas germinadas descrito por Breton *et al.* (2005a, 2006) condujo a síntomas reproducibles de la enfermedad tres meses después de la inoculación. Se demostró que las progenies de palma de aceite se pueden seleccionar temprano en el estado previvero por nivel de resistencia a la infección de *Ganoderma*. Idris *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares en este mismo estado, lo que corrobora la utilidad de este método de detección para los fitomejoradores.

El objetivo de la segunda parte de este documento es resaltar la eficiencia y la reproducibilidad de esta prueba de detección, después del primer paso de la caracterización de los parámetros.

## Materiales y métodos

### Observaciones de hendiduras/cavidades en forma estrella

La cavidad natural en forma de estrella se observó en palmas de aceite maduras, sanas excavadas antes de la resiembra, maduras sanas (10-15 años), en plántulas sanas de 20 meses de edad en el vivero y en palmas maduras afectadas por *Ganoderma*. Antes de la observación, las raíces se extirparon y se hicieron

cortes longitudinales y transversales en la zona de unión del tronco y la raíz.

## Implementación de una prueba de detección temprana

### *Material de siembra*

El material de siembra en estado de semilla germinada provenía de programas de mejoramiento genético de Sumatra Bioscience, en Lonsum, y de la sección de producción de semillas de Bangun Bandar en Socfindo.

Cada cruce fue evaluado con 5 replicaciones de 20 semillas germinadas. Al mismo tiempo se inocularon 20 semillas adicionales por cruzamiento, para usar como reemplazos, de ser necesario. Un mes después de la inoculación, y antes de la expresión de la enfermedad, las semillas no germinadas y anormales se reemplazaron con plántulas inoculadas de la misma progenie.

Se implementaron 10 ensayos independientes, cada uno de ellos comparando de 15 a 20 progenies, y se probaron 71 cruces individuales por lo menos dos veces en los ensayos de estos cruces; 22 se probaron por lo menos cuatro veces.

### *Fuente de inóculo*

El aislado dicariótico "J" de *Ganoderma boninense* utilizado en este trabajo se obtuvo de un basidiocarpo, y fue previamente caracterizado como un aislado agresivo por Breton *et al.* (2005a, 2006). El cultivo de hongos se mantuvo en agar papa dextrosa (APD) en cajas de Petri, en condiciones de oscuridad.

La fuente de inóculo se basó en inoculación artificial usando bloques de madera de caucho (BMC) como sustrato. Los bloques, con un volumen de 216 cm<sup>3</sup>, se hirvieron durante seis horas y se colocaron en bolsas de polipropileno resistentes al calor (dos bloques por bolsa). Se agregaron 30 mm de agar papa y las bolsas de polipropileno se sellaron con tapones de algodón hidrófobo cubiertos con papel de aluminio. Las bolsas se esterilizaron en autoclave durante 1 hora a 121 °C, se enfriaron durante la noche y luego se inocularon con seis fragmentos de micelio (25 mm<sup>2</sup>) de un cultivo de 15 días de *G. boninense* en APD. Las bolsas de polipropileno con los bloques de madera de caucho inoculados se incubaron en la oscuridad a 27 °C con

34% de humedad relativa. El tiempo de incubación de los bloques utilizado en este trabajo se estandarizó previamente en 12 semanas, de acuerdo con la tasa de variabilidad de la infección de las plántulas registrada en vivero y su eficiencia para discriminar diferentes progenies (Breton *et al.*, 2005a; 2006).

### *Método de inoculación*

La inoculación de semillas germinadas se realizó bajo sombra artificial caracterizada por una temperatura y una humedad relativa que, durante el día, no inhibe el crecimiento del micelio (Nawawi & Ho, 1990) y favorece el proceso de infección de la plántula en forma reproducible (Breton *et al.*, 2005a; 2006; Rees *et al.* 2007). La fuente de bloques de madera de caucho colonizada se colocó primero en la bolsa de polietileno en el vivero (20 x 30 cm) con suelo y la distancia entre las semillas germinadas y los bloques con inóculo se estandarizó en 5 cm, según las recomendaciones de Breton *et al.* (2005a; 2006). Las plantas se regaron diariamente y se aplicó fertilizante (15/15/6/4 NPK-Mg) de acuerdo con el estándar local programado para el manejo de la palma de aceite en vivero.

### *Registro de síntomas*

Al comienzo, el desarrollo de la enfermedad con base en los síntomas externos se registró cada cuatro semanas, luego cada dos semanas cuando aparecieron los primeros síntomas, incluyendo los foliares y/o en cuerpos fructíferos. Entre 22 y 28 semanas después de la inoculación, dependiendo del porcentaje promedio del ensayo, se hicieron cortes longitudinales en el tronco de las plántulas y se evaluó la severidad de los síntomas internos por estimación visual de la proporción de tejidos dañados por *G. boninense* con base en una escala establecida por Breton *et al.* (2006).

### *Análisis de los resultados*

Los resultados, con base en el porcentaje de infección, se sometieron a una prueba Anova después de cada censo. El valor F para el efecto de la progenie se utilizó para medir la importancia de la variación y el poder de discriminación de los ensayos en cada censo. Luego, los resultados se expresaron en un índice, similar al utilizado para interpretar las pruebas de resistencia a la marchitez vascular en África Occidental (Renard *et al.*, 1991; de Franqueville *et al.*, 1995). Este índice corresponde a la proporción entre el porcentaje de



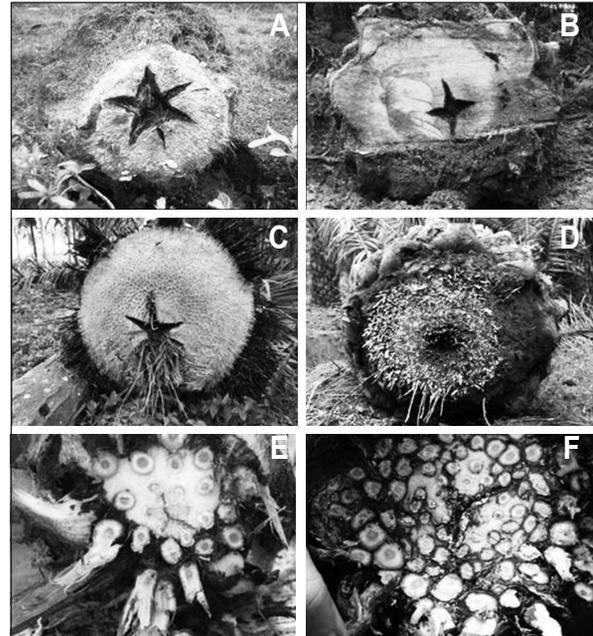
PBT expresado por un cruce y el porcentaje promedio del ensayo correspondiente. La base 100 corresponde al promedio de los porcentajes observados para el conjunto de progenies. El índice de una progenie representa la proporción de las plantas en esa progenie con PBT y el promedio de los porcentajes de plantas afectadas para todas las pruebas de progenies consideradas.

Un índice por debajo de 100 indica mayor resistencia que el promedio para las progenies evaluadas en la prueba; uno por encima de 100 indica mayor susceptibilidad. El supuesto del índice es que la población de progenies probadas en cada ensayo es similar para resistencia/susceptibilidad a PBT. El índice permite comparaciones generales y hace posible establecer claramente un rango de susceptibilidad, siempre y cuando los cruces estándar con una amplia gama de resistencia/susceptibilidad estén involucrados en los ensayos. Donde la distribución del número de índices obtenida en un conjunto de ensayos de una progenie es menor que 100 y el número de índices es mayor o igual que 100, generalmente se indica un genitor u origen junto con el índice. Por tanto, la comparación de los resultados de los índices entre ensayos es potencialmente engañosa sin el uso de cruces estándar.

## Resultados

### Observaciones de hendiduras/cavidades en forma de estrella

Se observa una cavidad lignificada en forma de estrella en la unión del tronco y la raíz, cualquiera que sea el origen o el estado fisiológico de la palma madura sana, (Figura 1a-d). Por lo general, se sitúa hacia el centro del área basal y puede tener una profundidad de varios centímetros. En algunas palmas de aceite se han reportado cavidades con una profundidad de hasta 30 cm. El origen de esta cavidad lignificada es probablemente una respuesta física de los tejidos en relación con el crecimiento natural de la planta. Su desarrollo se puede observar en plántulas muy jóvenes, lo que corrobora la hipótesis de una reacción física natural (figuras 1e y 1f). La hipótesis de un estrés de origen abiótico o biótico de la cavidad lignificada se puede descartar. La observación también reveló la presencia de varias raíces funcionales adheridas a su



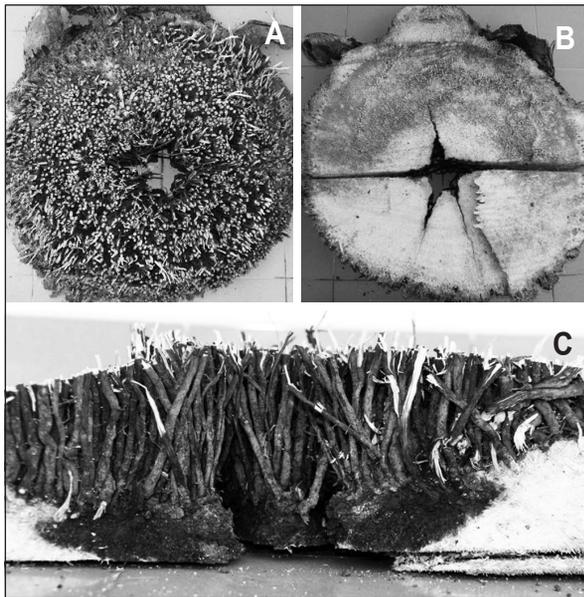
**Figura 1.** (A) Observaciones macroscópicas de la cavidad lignificada presente en la base del tallo de palmas sanas de Indupalma, Colombia; (B) Palmeras de los Andes; (C) Aek Loba Socfindo, Indonesia; (D) Tanah Gambus Socfindo, Indonesia. Fotos E y F muestran respectivamente los primeros pasos del desarrollo de la cavidad en plántulas de 8 y 18 meses de edad.

superficie (Figura 2). Esta cavidad, que es un espacio vacío, parece jugar un papel importante en la colonización del tronco por *Ganoderma*.

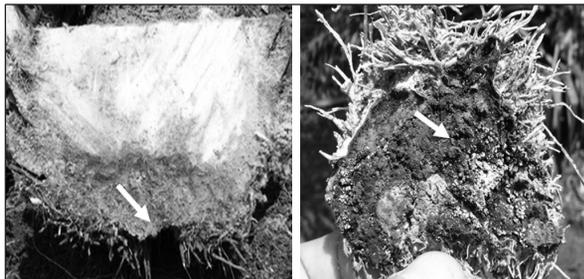
En estados muy tempranos de la infección en palmas de aceite maduras, la observación externa reveló la presencia de una masa fúngica altamente melanizada en la superficie de la cavidad basal lignificada (Figura 3). Presenta un aspecto morfológico similar a la estructura estromática observada en la superficie de los bloques de madera de caucho infectados.

La cavidad basal puede servir como cámara de cultivo para el desarrollo de *Ganoderma* (con producción de estructuras estromáticas), que, como bien se sabe, es un mal competidor en el suelo natural.

Las observaciones de los cortes transversales y longitudinales de los troncos de palmas infectadas al azar dentro de las plantaciones parecen indicar una invasión centrífuga y radial del hongo desde esta cavidad (Figura 4). En áreas comerciales no se observó invasión inicial de *Ganoderma* en palmas jóvenes



**Figura 2.** Corte transversal y longitudinal de la cavidad lignificada localizada en la base del tronco de una palma sana de 12 años de edad. Las fotos (A) y (B) muestran respectivamente la parte externa de la unión del tronco y la raíz y la cavidad lignificada penetrando el tronco. La vista transversal (C) muestra raíces funcionales adheridas dentro de la cavidad.



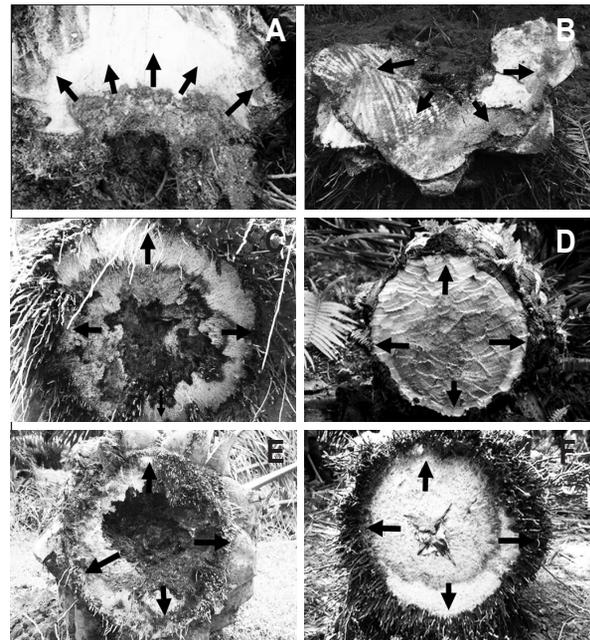
**Figura 3.** Disección del tronco de una palma de 10 años infectada (A). Fragmento de una cavidad lignificada (B) y la flecha indica las estructuras estromáticas cubriendo toda la superficie externa.

más allá del área periférica de la cavidad lignificada. Estas observaciones no excluyen la colonización simultánea de esta cavidad por más de un aislado de *Ganoderma*.

### Implementación de una prueba de detección temprana

#### *Cinética de la enfermedad - Rango de susceptibilidad*

La Figura 5 muestra la cinética de los mejores, los intermedios y los peores cruces en términos de



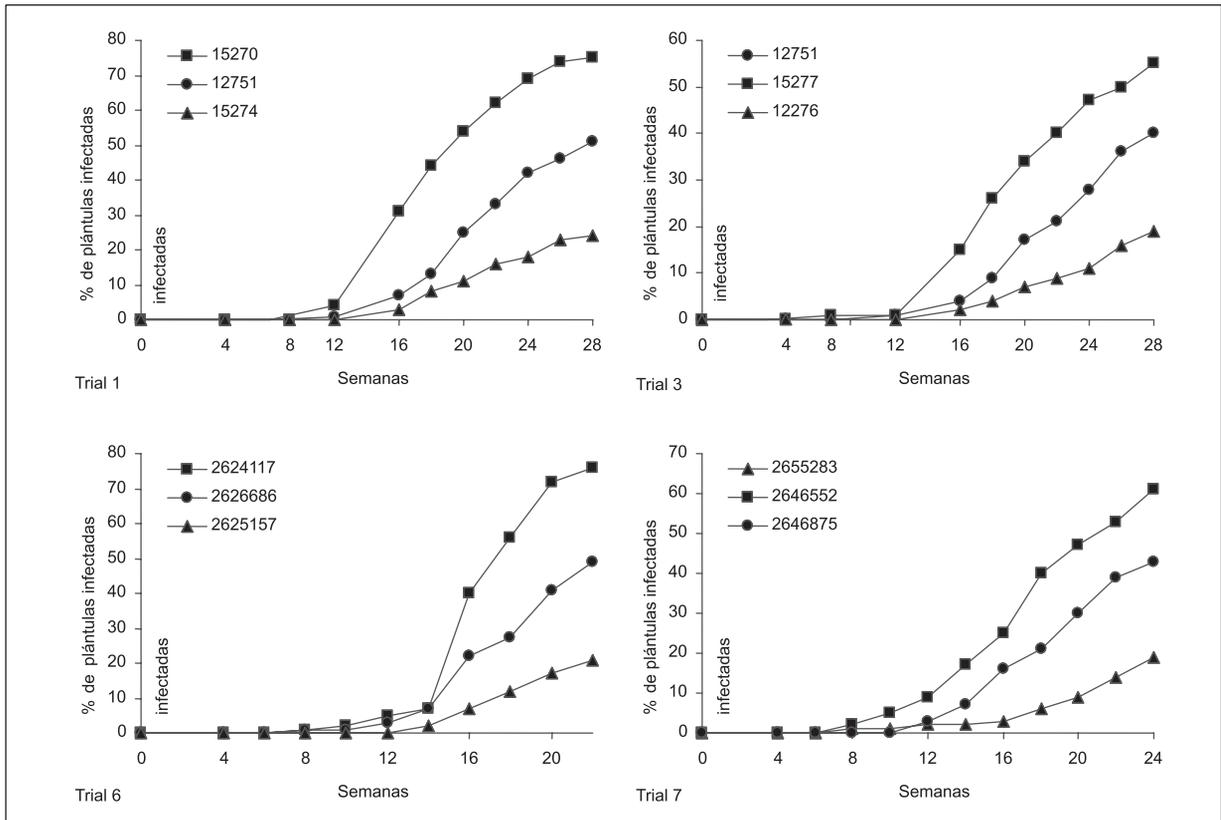
**Figura 4.** Observación del punto de unión del tallo y la raíz de palmas maduras infectadas en una plantación en el norte de Sumatra (Indonesia). La progresión de la pudrición (flechas) parece indicar una colonización centrífuga del tallo por el hongo de la cavidad basal lignificada.

susceptibilidad, en cuatro ensayos diferentes e independientes.

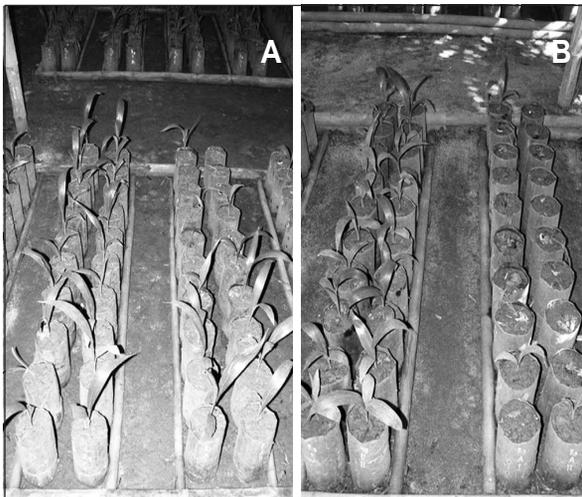
Los primeros síntomas generalmente aparecen entre 8 y 10 semanas después de la inoculación y las diferencias entre las progenies comienzan a notarse después de aproximadamente 14-16 semanas. A partir de la semana 16, la progenie más susceptible se puede distinguir claramente de las otras. Dependiendo de los ensayos, aparecen diferencias significativas entre progenies 18-20 semanas después de la incubación. Después de 28 semanas, las progenies más resistentes mostraron alrededor del 20% de infección, las intermedias de 40% y las más susceptibles cerca de 70%. La Figura 6 muestra las diferencias observadas en condiciones de vivero.

#### *Estabilidad del índice*

Como se mencionó, la progenie más susceptible se puede distinguir claramente de las otras después de 16 semanas de incubación. La tablas 1 y 2 muestran la evolución de los índices. De hecho, en este estado fue posible comenzar la clasificación de las progenies. La correlación (método de Pearsons) ya era bastante



**Figura 5.** Cinética del desarrollo de la PBT después de la contaminación artificial de semillas germinadas de palma de aceite con *Ganoderma boninense*. Para cada ensayo 1, 3, 6 y 7, 3 se seleccionaron progenies independientes de las progenies probadas en estos ensayos caracterizadas por diferentes niveles de susceptibilidad a la PBT. Cada punto representa el promedio de un total de 5 replicaciones de 20 plántulas.



**Figura 6.** Expresión de la enfermedad observada 20 semanas después de la inoculación artificial con *Ganoderma boninense* de semillas germinadas. 6A: progenie resistente a la izquierda y progenie intermedia a la derecha. 6B: progenie resistente a la izquierda y progenie altamente susceptible a la derecha.

alta cuando se compararon los resultados obtenidos después de 28 semanas de incubación. La correlación llegó a 0,95% cuando el promedio del ensayo se aproximaba al 30% de infección. Una infección promedio de 30% proporcionó al experimento información útil sobre el nivel de resistencia/susceptibilidad.

#### *Estabilidad de los valores F*

El poder discriminatorio de la prueba depende, por un lado, de las diferencias de infección entre progenies y, por el otro, de la reproducibilidad de los resultados entre replicaciones para una progenie dada. El valor F del efecto de progenie calculado por el Anova de tasa de infección se puede usar para cuantificar este poder de discriminación y para discutir su evolución con el tiempo.

Como se muestra en la Figura 7, para los ensayos 1 y 4, como se describe en las tablas 1 y 2, los valores F de efecto de progenie llegaron a un máximo alrededor de la semana 20 de incubación. En este punto

**Tabla 1.** Evolución del índice (ensayo 1)

Código de progenies probadas en ensayo 1	Índice (con base en síntomas externos)						
	16S	18S	20S	22S	24S	26S	28S
12675	164	152	135	127	121	117	116
12700	78	95	82	81	78	89	88
15270	267	210	178	167	158	154	143
12751	60	62	82	89	96	96	97
12752	78	86	96	97	89	94	95
15271	86	95	109	108	117	121	113
12773	103	119	119	116	119	114	118
12276	52	57	76	78	78	81	82
15272	138	119	112	110	114	112	115
15273	112	100	102	110	112	104	103
11672	95	105	86	89	85	83	88
12444	60	57	76	75	80	77	84
11143	52	67	79	83	89	96	97
15274	26	38	36	43	41	48	46
15275	129	138	132	127	123	114	115
Promedio ensayo (% infección)	11,6	21,0	30,3	37,1	43,7	48,1	52,4
Correlación con índice 28S	0,83	0,86	0,95	0,96	0,98	0,98	1,00

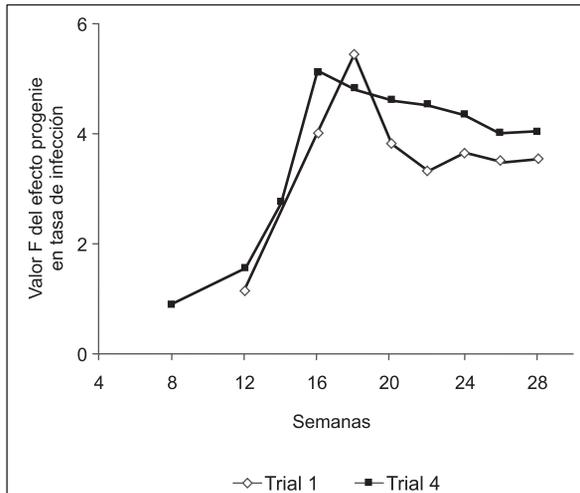
**Tabla 2,** Evolución del índice (ensayo 4)

Código de progenies probadas en ensayo 4	Índice (con base en síntomas externos)						
	16S	18S	20S	22S	24S	26S	28S
12675	236	231	199	171	153	140	135
12700	41	30	50	68	78	78	77
12752	82	82	99	100	104	103	104
15271	216	187	163	157	147	142	128
12271	103	97	81	86	89	91	90
12778	164	149	127	114	104	106	108
13790	144	134	163	157	141	132	128
15278	62	60	81	82	95	98	97
15279	21	45	50	57	63	62	77
15280	82	90	72	86	95	109	113
15281	92	119	104	107	101	93	101
15282	10	22	36	54	55	62	59
15283	92	97	122	104	112	114	110
15284	41	52	68	68	69	75	79
15285	113	104	86	89	95	96	95
Promedio ensayo (% infección)	9,7	13,4	22,1	27,9	34,7	38,7	44,4
Correlación con índice 28S	0,88	0,88	0,92	0,93	0,96	0,97	1,00

las tasas de infección eran altamente contrastantes entre las progenies cuya infección comenzó temprano y las progenies cuya infección apareció más tarde. Después de la semana 24, los valores F no variaron ampliamente y las diferencias relativas entre las progenies se estabilizaron.

### *Síntomas externos e internos*

Las tablas 3 y 4 muestran dos grupos de datos en los que los índices se calcularon independientemente: el primer grupo se calculó con base en síntomas visuales, el segundo con base en síntomas internos. El porcentaje de plántulas enfermas con síntomas internos es



**Figura 7.** Tasas de infección y valores del efecto progenie.

**Tabla 3.** Relación entre síntomas internos y externos (Ensayo 2)

Código de progenies probadas en ensayo 2	Índice (28 semanas después de inoculación)	
	Síntomas externos	Síntomas internos
12675	117	116
15270	125	117
12751	91	94
12752	85	85
12761	147	132
15271	126	123
15276	78	76
12773	108	105
12276	39	62
15273	78	84
11672	119	110
12444	106	108
11143	102	107
15274	59	68
15275	121	114
Índices de correlación externos/internos	0,98	
Promedio ensayo (% infección)	46,3	56,2

de 7 a 10% más alto que el porcentaje de síntomas visuales, pero la clasificación de las progenies no se modifica en forma significativa.

**Tabla 4.** Relación entre síntomas internos y externos (Ensayo 5)

Código de progenies probadas en ensayo 5	Índice (28 semanas después de inoculación)	
	Síntomas externos	Síntomas internos
2605855	91	101
2615580	114	117
2615930	73	81
2623333	91	101
2625369	97	99
2632316	107	103
2618415	114	104
2619450	116	111
2631689	103	94
2649170	99	106
2623332	69	79
2626686	103	103
2641311	83	86
2646554	101	99
2622233	114	108
2623005	105	109
2622745	95	89
2623074	110	104
2622009	99	93
2625157	118	112
Índices de correlación externo/interno	0,88	
Promedio ensayo (% infección)	50,7	60,5

### Reproducibilidad de los resultados

La Tabla 5 resume el comportamiento de las 22 progenies probadas por lo menos cuatro veces después de una inoculación temprana y también indica el estado en condiciones de campo, cuando se conocen. Los índices se calcularon cuando el promedio del ensayo llegó a alrededor de 30%.

Estos datos sugieren que no habría habido transferencia al campo de progenies altamente susceptibles, si los resultados de la prueba hubieran estado disponibles antes de la siembra.

Las progenies altamente resistentes tienen índices por debajo de 100 –ese es el caso para las progenies 4, 10 y 14–, mientras que las progenies altamente susceptibles tienen índices por encima de 100 –progenies 2 y 8, por ejemplo. La consistencia de estos resultados de índices entre los ensayos demuestra la reproducibilidad de de esta prueba de detección.

**Tabla 5.** Estado de las pruebas de campo y de vivero

Número	Código progenie	Estado en campo <sup>1</sup>	No. de ensayos <sup>2</sup>	Promedio índice	Distribución índice		Estado de prueba
					Id <sup>3</sup> <100	Id>100	
1	12658	Intermedio	4	86	3	1	Resistente a intermedio
2	12675	Susceptible	8	126	2	6	Susceptible
3	15278	-	4	79	3	1	Resistente
4	12700	Resistente	5	75	5	0	Resistente
5	15284	-	4	75	3	1	Resistente
6	12751	Intermedio	4	97	2	2	Intermedio
7	12752	Intermedio	6	109	2	4	Intermedio a susceptible
8	15271	-	8	141	0	8	Susceptible
9	12773	Intermedio	4	101	2	2	Intermedio
10	12276	Resistente	5	46	5	0	Resistente
11	12778	Intermedio	5	91	4	1	Resistente a intermedio
12	2615580	Exp. susceptible	7	113	2	5	Susceptible
13	2648858	Exp. susceptible	8	100	4	4	Intermedio
14	2654198	-	5	74	4	1	Resistente
15	2655003	Susceptible	5	105	2	3	Intermedio a susceptible
16	2648147	-	6	127	2	4	Susceptible
17	2653769	-	5	76	5	0	Resistente
18	2641311	Exp. Resistente	4	65	4	0	Resistente
19	2660428	-	4	112	1	3	Susceptible
20	2641666	Exp. Resistente	5	77	5	0	Resistente
21	2632316	-	4	95	2	2	Intermedio
22	2649172	Exp. Resistente	6	70	6	0	Resistente

1. Estado provisional en campo, sujeto a evolución

2. Número de ensayos en vivero en que la progenie ha sido probada

3. Índices

## Discusión

### Cavidad

El entendimiento del proceso de infección de la palma por *Ganoderma* involucra diferentes pasos que son difíciles de observar en condiciones naturales. Por tanto, el desarrollo de métodos reproducibles de inoculación (en vivero y rizotron) asociados a observaciones de campo permite proponer algunas hipótesis. Este estudio proporciona evidencia adicional en relación con el papel de una cavidad natural lignificada en forma de estrella presente en palmas maduras en la unión entre la raíz y el tronco. La cicatriz lignificada de la futura cavidad se puede observar en plántulas de ocho meses de edad, y parece ser el resultado de un proceso físico inducido por el crecimiento natural de la palma. En palmas maduras la cavidad es altamente lignificada y puede tener una profundidad de varias decenas de centímetros.

Asimismo, puede servir como cámara de cultivo para *Ganoderma* en esta interacción. Se sabe que *Ganoderma* es un mal competidor en el suelo natural, y la presencia de competidores en la cavidad es probablemente más limitada que en el suelo. Las observaciones de estructuras estromáticas en la cavidad demostraron la presencia de condiciones adecuadas para el desarrollo de *Ganoderma* (sustrato sólido, oscuridad, humedad, poca competencia). Estos micelios resistentes y altamente melanizados también se encontraron en la superficie de los bloques de madera de caucho infectados (Breton *et al.* 2005a; 2005b). Con el método de rizotron, los autores demostraron, utilizando aserrín de caucho infectado y bloques de madera de caucho, que el desarrollo de esta estructura era necesario para producir la infección. No se produjeron estructuras estromáticas en aserrín, únicamente en el sustrato sólido. El papel de las estructuras estromáticas probablemente no está



limitado a esta acción patogénica sino que también puede ser una protección contra los antagonistas o reacciones defensivas del hospedero.

No es fácil relacionar el papel de la cavidad en las observaciones de campo con el método de inoculación en vivero. En la inoculación artificial se usaron bloques de madera de caucho infectados para inocular plántulas jóvenes sin cavidad. Si se comparan los dos procesos de infección (natural y artificial), un punto común es la observación del desarrollo de estructuras estromáticas únicamente en sustratos sólidos (bloques de madera de caucho en vivero y cavidad lignificada en palmas maduras). En vivero, la distancia inicial entre la semilla germinada y la superficie superior de los bloques infectados se estandarizó en 5 cm. Es posible que, aun en la ausencia de la cavidad en plántulas muy jóvenes, los bloques infectados puedan reemplazarla en la inoculación en vivero. Esta podría ser una hipótesis para explicar la presencia necesaria de estructuras estromáticas para inducir infección por *Ganoderma*. Se realizarán algunos ensayos en campo y en vivero para confirmar la hipótesis, lo mismo que ensayos de tratamiento localizados lo más cerca posible a la cavidad.

### Prueba de detección

La mayoría de las técnicas de inoculación descritas hasta la fecha (Khairudin *et al.*, 1991; Sariah *et al.*, 1994; Idris *et al.*, 2004; Rees *et al.*, 2007) han utilizado plántulas de por lo menos tres meses de edad, con un período de prueba de varios meses. Esta prueba de detección se ha reducido a 16 semanas como resultado de la investigación de varios parámetros importantes involucrados en el proceso de infección. Entre ellos, los más importantes para obtener una infección eficiente y rápida en plántulas son el tiempo de incubación del inóculo en los bloques y la sombra en condiciones de pre-vivero, para mantener una temperatura y una humedad adecuadas para el crecimiento del hongo (Breton *et al.*, 2005a). Las inoculaciones en el estado de semilla germinada permiten el desarrollo de síntomas 10 semanas más tarde. Breton *et al.* (2005a, 2006) mostraron una correlación positiva entre semillas germinadas y plántulas de 6 meses de edad en la discriminación entre progenies de susceptibilidad a *Ganoderma*. Este resultado sugiere que la respuesta de las progenies a la inoculación artificial

en vivero se conserva independientemente del estado fisiológico utilizado para la prueba de detección. Paralelamente, los autores no han detectado interacciones específicas entre aislados de *Ganoderma* y los materiales de siembra probados.

Por tanto, obtener resultados reproducibles en la cinética de la infección y el poder de discriminación entre progenies está estrechamente relacionado con la distancia entre la semilla germinada y la superficie superior de la fuente de inóculo.

Esta distancia debe ser calibrada sin dañar el micelio en la superficie superior de los bloques infectados. El daño no controlado de la estructura estromática durante la calibración de la distancia conduce a la menor reproducibilidad de la cinética de la infección entre ensayos (datos no publicados).

Una de las ventajas de inocular bolsas en el vivero en estado de semilla germinada es la reducción en tiempo y espacio. Esto es crucial al seleccionar cientos de progenies al año. El método de detección descrito en este documento es rápido y fácil de establecer en condiciones de pre-vivero y limita la fuente de variabilidad causada por manipulación humana. Por esta razón, cada paso del método fue previamente estudiado, calibrado y estandarizado para lograr este nivel de consistencia.

Otro punto clave con el estado de semilla germinada es que evita heridas a la raíz que pueden ocurrir cuando las plántulas se traspasan a las bolsas en el vivero. Heridas significativas en las raíces pueden interferir con los mecanismos biológicos de resistencia a la marchitez causada por *Fusarium* y con la relación entre pruebas tempranas y resultados de campo (de Franqueville H., comunicación privada, 2002). Por tanto, las diferentes fuentes de resistencia parcial deben tenerse en cuenta. El efecto de heridas en la raíz también ha sido detectado en el patosistema *Ganoderma boninense*/palma de aceite (Breton *et al.*, 2006). Utilizando plántulas de tres meses de edad, los autores demostraron que una herida en la raíz aumenta significativamente la velocidad en la aparición de los síntomas de la enfermedad.

La cinética del desarrollo de la enfermedad es comparable entre los diferentes ensayos, y los valores de F se estabilizan después de un máximo relacionado con la detección de las progenies más susceptibles.

De manera que es posible concluir una prueba 22 semanas después de la inoculación, similar al caso de la prueba de marchitez por *Fusarium* en África. Este es un componente importante en la realización práctica y en la planeación de pruebas sucesivas de detección que involucran varios cientos de cruces al año.

El grado de susceptibilidad de las progenies se detecta temprano durante la prueba y permanece estable. También permanece estable cuando los síntomas internos y externos se analizan independientemente.

Como en el caso de los resultados de la marchitez por *Fusarium*, los datos se expresan como índice promedio junto con la distribución del número de índices por debajo de 100 y el número de índices mayores o iguales a 100 obtenidos en los ensayos. Progresivamente, el índice medio y la distribución indican claramente el nivel de resistencia del material probado. Estos son los resultados acumulados de una semilla padre, por ejemplo, o los resultados de un origen que indican claramente si transmiten resistencia/susceptibilidad. La detección de resistencia a *Ganoderma* probablemente sigue la misma regla.

En las pruebas de resistencia a *Fusarium* se utiliza un conjunto de progenies estándar resistentes y susceptibles para garantizar que las comparaciones entre las diferentes pruebas sean imparciales. Algunas de las progenies probadas en los ensayos descritos en este documento y en ensayos subsiguientes, provenientes de una colección genética diversa, se convertirán en cruzamientos estándar. Socfindo y Lonsum están desarrollando un conjunto de cruzamientos estándar para proporcionar una comparación mejorada de los resultados de los diferentes ensayos, utilizando diferentes aislados de *Ganoderma*.

Los datos presentados en este documento indican que esta prueba de detección temprana funciona

bien. Así que estas dos compañías están desarrollando capacidades de prueba para permitir la selección de varios cientos de cruzamientos al año, posibilitando la integración de esta herramienta en sus respectivos programas de mejoramiento.

Mientras tanto, se debe investigar el mejoramiento continuo de las técnicas, como se ha hecho para la marchitez por *Fusarium* en África. Por ejemplo, en las pruebas de detección de *Ganoderma*, el tamaño de los bloques de madera de caucho es importante porque la cantidad que puede ser procesada y esterilizada afecta las capacidades de detección.

Para concluir, se debe resaltar que los programas de mejoramiento genético para resistencia pueden ser un componente importante del manejo integrado de la pudrición basal del tallo. Se presentarán diferentes niveles de resistencia parcial, pero seguramente no resistencia total, que podría no ser duradera con este tipo de patógeno. Como una consecuencia práctica, los gerentes de las plantaciones no deben ahorrar esfuerzos en la implementación de prácticas culturales y de saneamiento. Este manejo integrado, con todos sus componentes, permitirá una disminución progresiva de la enfermedad y ciclos de resiembras en las mejores condiciones posibles.

## Agradecimientos

El trabajo descrito en este documento se llevó a cabo bajo un acuerdo de colaboración científica entre el Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad), PT Socfin Indonesia (Socfindo) y PT PP London Sumatra Indonesia TBK (Lonsum). Los autores desean agradecer a la gerencia de Socfindo y Sumatra Bioscience (Lonsum) por el permiso para publicar este documento.



## Bibliografía

- Akbar, U.; Kusnady, M.; Ollagnier, M. 1971. Influence de la nature du matériel végétal et de la nutrition minérale sur la pourriture sèche du tronc due à *Ganoderma*. *Oléagineux* 26: 527-534.
- Ariffin D.; Idris A.S. 2002. Progress and research on *Ganoderma* basal stem rot of oil palm. Seminar on elevating the national oil palm

productivity & recent progress in the management of peat and *Ganoderma*. Kuala Lumpur, Malaysia, 6-7 may 2002. Paper 12: 50 pp.

- Breton, F.; Hasan, Y.; Hariadi; Lubis, Z.; de Franqueville, H. 2005a. Characterization of parameters for the development of an early screening test for basal stem rot tolerance in oil palm progenies. In: *Agriculture, biotechnology & sustainability conference, PIPOC International Palm Oil Congress* 167-183 (Eds Malaysian Palm Oil Board). Kuala Lumpur.



- Breton, F.; Hasan, Y.; Hariadi, Lubis, Z.; de Franqueville, H. 2005b. Rhizotron: a demonstrative tool for monitoring *in vivo* the infection process of oil palm seedlings by *Ganoderma boninense*. In *Agriculture, biotechnology & sustainability conference, PIPOC International Palm Oil Congress*, 971 (Eds Malaysian Palm Oil Board). Kuala Lumpur.
- Breton, F.; Hasan, Y.; Hariadi, Lubis, Z.; de Franqueville, H. 2006. Characterization of parameters for the development of an early screening test for basal stem rot tolerance in oil palm progenies. *Journal of Oil Palm Research Special Issue*:24-36.
- Corley, RHV.; Tinker, P.B. 2003. *The Oil Palm*. Fourth Edition. Blackwell Publishing, 562 pp.
- de Franqueville, H. 2003. Review paper: oil palm bud rot in Latin America. *Experimental Agriculture* 39:225-240.
- de Franqueville, H.; Diabaté, S. 1995. La fusariose du palmier à huile en Afrique de l'Ouest. *Plantations, Recherche, Développement* 2:5-13.
- de Franqueville, H.; Diabaté, S. 2004. Status on oil palm vascular wilt. In: *Proceedings of the International Conference On Pests and diseases of Importance to the Oil Palm Industry*, 30-36 (Eds Malaysian Palm Oil Board). Kuala Lumpur.
- de Franqueville, H.; Renard, J.L. 1990. Improvement of oil palm vascular wilt tolerance. Results and development of the disease at the R. Michaux plantation. *Oléagineux* 45:399-405.
- de Franqueville, H.; Asmady, H.; Jacquemard, J.C.; Hayun, Z.; Durand-Gasselín, T. 2001. Indications on sources of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic resistance and susceptibility to *Ganoderma* sp., the cause of basal stem rot. In *Agriculture, PIPOC International Palm Oil Congress*, 420-431 (Eds Malaysian Palm Oil Board). Kuala Lumpur.
- Durand-Gasselín, T., Asmady, H., Flori, A., Jacquemard, J.C., Hayun, Z., Breton, F. & de Franqueville, H. 2005. Possible sources of genetic resistance in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) to basal stem rot caused by *Ganoderma boninense* – prospects for future breeding. *Mycopathologia* 159:93-100.
- Flood, J. 2006. A review of Fusarium wilt of oil palm caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*. *Phytopathology* 96:660-662.
- Idris, A.S.; Khushairi, A.; Ismail, S.; Ariffin, D. 2004. Selection for partial resistance in oil palm to *Ganoderma* basal stem rot. *Journal of Oil Palm Research* 16:12-18.
- Idris, AS.; Kushairi, D.; Ariffin, D.; Basri, MW. 2006. Technique for inoculation of oil palm germinated seeds with *Ganoderma*. In *MPOB information series*, N°321 (Eds Malaysian Palm Oil Board). Malasia.
- Khairudin, H.; Ling, TK.; Razak, ARA. 1991. Pathogenicity of *Ganoderma boninense* Pat. On oil palm seedlings. In *Agriculture, PORIM International Palm Oil Congress*, 418-423 (Eds Malaysian Palm Oil Board). Kuala Lumpur.
- Martínez, G.; Sarria, GA.; Torres, GA.; Aya, HA.; Ariza, JG.; Rodríguez, J.; Vélez GC.; Varón, F.; Romero, H.; Sanz, H. 2008. *Phytophthora* sp es el responsable de las lesiones iniciales de la pudrición des cogollo (pc) de la palma aceite en Colombia. En *Memorias de la VIII Reunión Técnica Nacional de Palma Aceite*. Compensar, 22-24 de septiembre Bogotá.
- Miller, RNG.; Holderness, M.; Bridge, PD.; Chung, GF.; Zakaria, MH. 1999. Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. *Plant Pathology* 48:595-603.
- Nawawi, A.; Ho, YW. 1990. Effect of temperature and pH on growth pattern of *Ganoderma boninense* from oil palm in Peninsular Malaysia. *Pertanika* 13:303-307.
- Pilotti, CA.; Sanderson, FR.; Aitken, E.A.B., 2002. Sexuality and interactions of monokaryotic and dikaryotic mycelia of *Ganoderma boninense*. *Mycological Research* 106:1315-1322.
- Rees, R.W.; Flood, J.; Hasan, Y.; Cooper, RM. 2007. Effects of inoculum potential, shading and soil temperature on root infection of oil palm seedlings by the basal stem rot pathogen *Ganoderma boninense*. *Plant Pathology* 56:862-870.
- Renard, J.L. ; Noiret, J.M. ; Meunier, J. 1980. Sources et gammes de résistance à la fusariose chez les palmiers à huile *Elaeis guineensis* et *Elaeis melanococca*. *Oléagineux* 35:387-393.
- Renard, J.L. ; de Franqueville, H. ; Meunier, J. ; Noiret, J.M. 1991. Méthode d'évaluation du comportement du palmier à huile vis-à-vis de la fusariose vasculaire due à *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*. Résultats. In *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*, 121-134 (Eds AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext). Paris.
- Sarria, GA.; Torres, GA.; Aya, HA.; Ariza, JG.; Rodríguez, J.; Vélez, GC.; Varón, F.; Martínez, G. 2008. *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la pudrición des cogollo (pc) de la palma aceite en Colombia. *Palmas* (edición especial) 39(3): 31-44.
- Sariah, M.; Hussin, MZ.; Miller, RNG.; Holderness, M. 1994. Pathogenicity of *Ganoderma boninense* tested by inoculation of oil palm seedlings. *Plant Pathology* 43: 507-510.
- Singh, G, 1991. *Ganoderma* - The scourge of the oil palm in the coastal areas. *The Planter* 67: 421-444.