

Pruebas de patogenicidad con *Fusarium solani* y *Thielaviopsis* sp. en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.)*

Pathogenicity tests with *Fusarium solani* and *Thielaviopsis* sp. on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

LUIS EDUARDO NIETO PAEZ¹

RESUMEN

Varias investigaciones indican que con la pudrición de cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) se encuentran asociados varios hongos, entre ellos *Fusarium solani* y *Thielaviopsis* sp. encontrados consistentemente en palmas enfermas, en la plantación "La Cabaña" de los Llanos Orientales. Con el fin de reproducir la enfermedad se obtuvo inóculo en PDA, el cual se multiplicó en folíolos de la flecha y también se extrajo de esporodocios y de trozos de cogollo de palmas afectadas en condiciones naturales. De éstas inoculaciones se obtuvieron seis cepas que se emplearon para inocular grupos de 6 y 8 palmas sanas, causando heridas previas en el cuello de las palmas. Los resultados indicaron que el inóculo desarrollado directamente de tejidos de cogollo de palmas afectadas en condiciones naturales reprodujo más manchas y quemazón de folíolos que el inóculo obtenido de PDA, sin embargo, las palmas se recuperaron y en ningún caso se logró reproducir la enfermedad. Se considera que debe existir un factor de predisposición desconocido que los hongos requieren para poder establecerse en la palma.

Palabras claves: Pudrición de cogollo, Hongos, Enfermedades fungosas, *Fusarium solani*, Palma de aceite, *Thielaviopsis* sp.

SUMMARY

Several reasearch works show that there are various fungi associated with bud rot of oil palm. *Fusarium solani* and *Thielaviopsis* sp. were consistently found on diseased trees at La Cabaña plantation on the Colombian Llanos. To reproduce the disease, an inoculum kept in PDA was obtained and multiplied on spear leaflets. Inoculum was also extracted from sporodochies and bud pieces of diseased trees under natural conditions. Six strains were obtained and used to inoculate groups of 6 and 8 healthy trees, by making lesions on the stem. Results showed that the inoculum obtained directly from bud tissue of diseased trees under natural conditions produced more spots and scorching on the leaflets than the inoculum obtained with PDA. However, the trees recovered and the disease could not be reproduced. It is concluded that there must be an unknown predisposing factor required by fungi to establish on oil palm trees.

*. Contribución del convenio ICA - CENIPALMA.

1. Ing. Agrónomo, M. Sc. Fitopatólogo. Convenio ICA-CENIPALMA. Apartado Aéreo 151 123 Eldorado. Santafé de Bogotá, Colombia.

INTRODUCCION

Los primeros registros de un patógeno asociado con la pudrición de cogollo (PC) datan de 1962, cuando Kovavich, citado por Ochoa y Bustamante (1974), mencionó que el hongo *Phytophthora* estaba asociado con la enfermedad. Más tarde, a raíz del devastador ataque en la plantación "La Arenosa" (1964-1969), se formularon diversas hipótesis sobre la causa, unas orientadas a que se trataba de desórdenes fisiológicos o nutricionales (Rojas 1972), otras a virus y bacterias (Chávez 1986; Turner 1981; Mazzolini et al. 1990), y otras a hongos (Chávez 1986; Figueroa 1977; Nieto y Gómez 1991; Ochoa y Bustamante 1974).

Según Turner (1981), de palmas con pudrición de cogollo en el Congo, Malaysia, Panamá y Venezuela se han aislado 12 hongos. En Palmeras del Ecuador se estudió la microflora asociada con la pudrición y se encontraron hongos de los géneros *Phoma*, *Cephalosporium*, *Pyrenochaeta*, *Pestalotia* y *Colletotrichum*, principalmente, y en la Estación Experimental Santo Domingo, del INIAP en Ecuador, concluyeron que *Fusarium oxisporum* (Schl.) Snyder et Hans. y *F. roseum* (Link.) Snyder et Hans. estaban asociados con la pudrición de cogollo (Chávez 1986; Figueroa 1977).

Renard (1991), a partir de tejidos infectados, aisló los hongos *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr., *F. oxisporum*, *Diplodia* sp. y *Mucor* sp. así como bacterias y levaduras.

En Colombia, Sánchez (1967) hizo la primera descripción de los síntomas de la pudrición de cogollo y aisló algunas especies de *Fusarium*, pero no logró reproducir la enfermedad. Ochoa y Bustamante (1974), en Urabá, encontraron el hongo *F. moniliforme* var. *subglutinans* Wr. & Rg. que reprodujo síntomas de pudrición de flecha, pero no descendía al cogollo. Nieto y Gómez (1991), en los Llanos Orientales, aislaron varios hongos pero consideraron que *F. solani* era el más probable agente causal de la enfermedad.

De pudriciones de flechas simples invariablemente

se han aislado especies de *Fusarium*. En Brasil, Martins (1990) aisló 20 especies de hongos, entre ellos varias especies de *Fusarium*.

Trabajos realizados en Ecuador y Colombia han demostrado que con aplicaciones de fungicidas se logra reducir la incidencia de la pudrición de cogollo.

Trabajos realizados en Ecuador y Colombia han demostrado que con aplicaciones de fungicidas se logra reducir la incidencia de la pudrición de cogollo, en un porcentaje tan bajo que no justifica su empleo comercial; sin embargo, esto es una evidencia más de la existencia de un hongo involucrado en el problema (Chávez 1986; Figueroa 1977; Nieto y Gómez 1991; Turner 1981), aún cuando es probable que haya más de un factor implicado.

No obstante las evidencias anteriores, ningún investigador ha logrado reproducir la enfermedad y como la literatura registra un caso semejante, en el cual *F. solani*, causante del tizón de los cítricos, fue calificado por varios años como saprofito, a pesar de encontrarse hasta

en los tejidos sanos (Graham et al. 1985; Labuschagne et al. 1987), se consideró conveniente intentar reproducir en palma de aceite la pudrición de cogollo con *F. solani* y *Thielaviopsis* sp., por encontrarse siempre asociados con la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en la Hacienda "La Cabaña", Municipio de Cumaral (Meta), a 305 msnm y 3.100 mm de precipitación, entre marzo y junio de 1991.

Preparación de inóculo

Multiplicación de colonias en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA)

Se emplearon las cepas de *F. solani* mantenidas en PDA y seleccionadas por Nieto y Gómez (1991) en su trabajo sobre identificación del agente causal del complejo pudrición de cogollo, las cuales se mostraron patogénicas sobre trozos de flechas sanas; además, se emplearon otras dos cepas de hongos obtenidas en la misma plantación sobre tejidos de palmas afectadas en forma natural.

A cada caja de petri de 9 cm de diámetro se le agregó, por cuatro veces, 10 ml de agua destilada estéril, agitándola para desprender las conidias; luego se aforó a 200 ml con agua destilada estéril. Esta cantidad fue suficiente para inocular seis palmas.

Esporulación en folíolos con esporodoquios

Folíolos de flechas con manchas cafés en los que se observaban esporodoquios de *Fusarium* sp., se pusieron en cámara húmeda durante 24 horas, se rasparon con un bisturí y luego se lavaron con agua destilada estéril, hasta obtener una concentración aproximada de 400.000 conidias por ml.

Multiplicación de E. solani en trozos de folíolos sanos

En trozos de folíolos de flecha sana se causaron heridas con un alfiler y sobre éstas se depositaron gotas de la suspensión de conidias de *F. solani* aislado en PDA. Todo el material se incubó en cámara húmeda durante 96 horas a la temperatura del laboratorio (20-28°C); transcurrido este tiempo, los trozos cubiertos con el hongo se lavaron para recolectar las conidias.

Esporulación en cogollos afectados

Con el fin de seleccionar cepas de *F. solani* de rápida y abundante esporulación, evitando la pérdida de patogenicidad en PDA, se compararon trozos de pecíolos, raquis y folíolos de cogollos de palmas con diferente tipo de daño, puestos en cámara húmeda a la temperatura del laboratorio. La cepa de mayor esporulación se empleó en la prueba de patogenicidad. La identificación del hongo se hizo por observación de sus estructuras reproductivas al microscopio.

Los materiales probados fueron:

T1: Tejidos de cogollo de una palma con síntomas de pudrición de flecha, pf seca, con raquis suberizado

T2: Tejidos de pf seca, ligeramente húmeda, sin suberización.

T3: Tejidos de cogollo con pudrición de flecha y hojas amarillas (PC), tipo pudrición húmeda con folíolos de bordes oscuros y raquis suberizado.

T4: Tejidos de PC, con pudrición húmeda muy blanda.

Los tejidos esporulados del mejor tratamiento se lavaron con agua destilada, hasta obtener una suspensión concentrada de varios millones de conidias del hongo.

Germinación de conidias

Para conocer la viabilidad de las conidias se empleó parte de la suspensión de *F. solani* obtenida de tejidos de cogollo con pudrición de flecha seca, ligeramente húmeda sin suberización (T₂), la cual se incubó en el laboratorio a temperatura de 20 a 28°C. La germinación se determinó al microscopio a intervalos de 4, 12 y 18 horas.

Además, con el mismo inóculo se hizo una prueba de germinación de conidias, agregando a la suspensión extracto de los materiales básicos en los medios en que se multiplicó el hongo como papa tejidos del cogollo de palma y azúcar. Los extractos de papa y cogollo de palma se obtuvieron mediante 20 minutos de cocción en agua y posterior filtrado. Las concentraciones probadas fueron: extracto de papa: al 5,0%, extracto de tejido de palma al 2,5% y dextrosa al 1,0 y 5,0%, estas se mezclaron en proporción 1:1 con la suspensión de conidias. De cada concentración se hicieron 3 repeticiones en tubos de ensayo.



Inoculación en palmas de tres años

Palmas de vivero, de 3 años de edad, se inocularon mediante el método de producir heridas en los tejidos internos del cuello y en la parte inferior de las flechas y sobre ellas agregar, por aspersión y gravedad, 30-40 ml de una suspensión de conidias de los hongos en estudio. Con cada hongo se inocularon grupos de 6 y 8 palmas. La labor se realizó entre los meses de abril-junio de 1991 que fueron de alta precipitación, y entre las 5:30 y 6:20 p.m., para evitar la posible pérdida de germinación de las conidias por deshidratación.

Las características principales de los hongos empleados en la inoculación fueron:

1. *F. solani* crecido en PDA muy abundante en microconidias.
2. *F. solani* crecido en PDA con macro y microconidias más o menos en cantidades iguales.
3. Cepa de un hongo no identificado, crecido en PDA, con microconidias en cadena y en forma de barril.
4. *F. solani* más *Thielaviopsis* sp. multiplicados en PDA.
5. *F. solani* extraído de esporodoquios desarrollados en folíolos de flechas con pudrición, bajo condiciones de campo.
6. *F. solani* extraído del cogollo de palma con PC seca, ligeramente húmeda que no presentaba tejidos suberizados.

Después de la inoculación, las palmas se observaron cada 8 días durante tres meses y se registraron los síntomas de daño en los sitios donde se depositó el inóculo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Preparación de Inóculo

Multiplicación de colonias en PDA.

La multiplicación de los hongos en el medio de cultivo PDA fue excelente; a los 7 días cada caja

produjo 200 ml de una concentración de 2 a 3 millones de conidias/ml, contrario a lo que ocurre en varias especies de *Fusarium*, en las cuales los carbohidratos reducen y retardan la esporulación, además de producir variaciones en la forma de las conidias y pérdida de patogenicidad (Nelson et al. 1983). Según esto autores, los tipos de *Fusarium* que producen esporodoquios (entre ellos *F. solani*) a menudo mutan en la naturaleza y en medios de cultivo, y los mutantes a su turno dan origen a otros. En aislamientos patogénicos, estos mutantes frecuentemente exhiben una pérdida de virulencia. Lo anterior explica la variación obtenida en la multiplicación del hongo, y por lo tanto, en las pruebas de patogenicidad se incluyeron dos cepas aparentemente diferentes.

Esporulación en folíolos con esporodoquios

El inóculo obtenido de esporodoquios fue muy uniforme en cuanto al tipo de conidias cilíndricas que lo formaron. Sin embargo, no hubo seguridad sobre la identificación de la especie de *Fusarium* empleada porque estas estructuras son formadas por varias especies de este género.

Multiplicación en trozos de folíolos sanos

La esporulación de *F. solani* en trozos de folíolos inoculados fue mala y demoró 5 días, y además se contaminó con otras especies de *Fusarium* y con bacterias.

Esporulación en cogollos afectados

A las 48 horas, la esporulación de los tejidos afectados del tratamiento T₂ (Tejidos de pf seca, ligeramente húmeda, sin suberización) fue alta. Todos los tejidos del cogollo: pecíolos, raquis y folíolos con síntomas de pudrición seca, ligeramente húmeda, sin suberización, se cubrieron con una ligera capa de micelio y conidias de *F. solani*, por lo tanto, esta cepa se seleccionó para incluirla como un tratamiento en las pruebas de patogenicidad. El tratamiento T₁ o sea Tejidos de cogollo con síntomas de pf seca, con raquis suberizado, tan sólo mostró indicios de esporular, y a las 96 horas se observó esporulación sobre las manchas pero no sobre el tejido suberizado los tratamientos T₁ y T₄ no esporularon. A los 8 días, los tejidos de todos. Los

En varias especies de Fusarium, los Carbohidratos reducen y retardan la esporulación.

tratamientos estaban descompuestos, con ligeros indicios de *Fusarium* spp. en T₃ y T₄. Se concluyó que la mejor esporulación se obtenía de pudriciones secas que aún no tenían áreas suberizadas.

Germinación de conidias

Los resultados de los tratamientos con extractos de papa, cogollo de palma y azúcar en la germinación de las conidias, mostraron que a las 10 horas ninguno de los tratamientos había iniciado la germinación, por lo cual cada suspensión de conidias se dividió en dos partes, una de ellas se traspasó a cajas de petri de 60 mm y la otra a tubos de ensayo, para así obtener mayor oxigenación.

A las 18 horas, la germinación de las conidias en los tubos de ensayo fue del 1 al 2% y no hubo diferencias entre los tratamientos ni las repeticiones, mientras que en las cajas de petri la germinación fue ligeramente mayor. Los resultados fueron así: agua 3%, extractos de papa y cogollo de palma 2% y en glucosa 5%. No hubo diferencias entre las dosis. La contaminación bacteriana fue tan alta que fue necesario suspender las observaciones. Por lo tanto, se sugiere que estas pruebas se deben repetir con colonias puras y con una mayor asepsia.

Inoculación en palmas de tres años

Ninguna de las palmas inoculadas reprodujo los síntomas de la enfermedad. Las heridas causadas en el cuello de las plantas inoculadas cicatrizaron igual que las producidas en el testigo. En tres palmas inoculadas con *Fusarium* cultivado en PDA hubo manchas de 2 a 5 cm de largo. Las mismas manchas, pero con crecimiento hasta de 20 cm, se produjeron en dos palmas de las seis inoculadas con conidias de esporodoquios y en seis de las ocho inoculadas con conidias de cogollo afectado. En éste caso, algunos folíolos se secaron por completo. Todas las manchas subieron con el crecimiento de las flechas, hasta perderse cuando se convirtieron en hojas. Lo anterior descarta la hipótesis de que el resultado negativo fue debido a la pérdida de

patogenicidad del hongo en PDA y se confirma la mayor patogenicidad de las conidias desarrolladas directamente en los tejidos de palma.

Se concluyó que con los conocimientos actuales era infructuoso insistir en inocular con *F. solani* y *Thielaviopsis* sp., ya que aparentemente las palmas empleadas eran resistentes o no tenían el factor de predisposición que hace posible el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, se considera que los resultados negativos no son prueba definitiva para descartar éstos hongos como posibles agentes causales, ya que la literatura registra casos semejantes,

como el del tizón de los cítricos. Por muchos años se aisló consistentemente *F. solani*, incluso de tejidos sanos, y la enfermedad no se pudo reproducir hasta tanto las investigaciones básicas demostraron que para reproducir la pudrición, los árboles debían sufrir un estrés previo y una baja concentración de almidón en las raíces (Graham et al. 1985; Labuschagne et al. 1987). En palma aceite son varios los trabajos que consideran que para reproducir la enfermedad se requiere de un factor de predisposición tal como presencia de nitritos, desbalance nutricional o deficiencias de boro y calcio (Rojas 1972).

Igualmente, muchas pruebas de patogenicidad pudieron haber fracasado por un manejo indebido del hongo, ya que *F. solani* en PDA tiene una alta capacidad de mutación hacia cepas no patogénicas (Nelson et al. 1983); además, está demostrado que las limitaciones en la formación de la

cutinasa por el hongo, inhiben la germinación de las conidias (Labuschagne et al. 1987) a pesar de que cantidades pequeñas del hongo pueden causar fuertes pudriciones, por un daño indirecto, ocasionado por los metabolitos tóxicos que produce (cumarina y ácido fusárico).

En consecuencia, se considera necesario realizar investigaciones básicas previas sobre factores de predisposición, antes de continuar con las pruebas de patogenicidad.

***Las
inoculaciones
realizadas con
los hongos
Fusarium solani
y Thielaviopsis
sp., asociados
con la pudrición
de cogollo, sobre
palmas de aceite
de 3 años de
edad fueron
negativas.***

CONCLUSION

Las inoculaciones realizadas con los hongos *Fusarium solani* y *Thielaviopsis* sp., asociados con la pudrición de cogollo, sobre palmas de aceite de 3 años de edad fueron negativas. No obstante, por analogía con el tizón de los cítricos, se considera que éste resultado no es una prueba definitiva para descartar dichos hongos como posibles agentes causales de la pudrición de cogollo, y se recomienda realizar estudios básicos sobre factores predisponentes.

BIBLIOGRAFIA

CHAVEZ, M.F. 1986. Enfermedades de la palma africana en Ecuador y su combate. INIAP, Quito, Ecuador. 19p. (Manual No. 8)

FIGUEROA, M. 1977. Determinación del agente causal de la pudrición de la flecha de la palma africana (*Elaeis guineensis*) en el Ecuador. Facultad de Agronomía, Universidad de Guayaquil, Guayaquil. 47p. (Tesis Ing. Agrónomo).

GRAHAM, J.A.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER L.W.; LEE, R. F.; MARAIS, L. M.; BENDER, G.S. 1985. Comparison of citrus tree declines with necrosis of major root and their association with *Fusarium solani*. Plant Disease (Estados Unidos) v.69, no.12. p.1055-1058.

LABUSCHAGNE, N; KOTZE, J. M.; PUTTERRILL, J.F. 1987. Incidence of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* in citrus root and infection by *F. solani*. Phytomycolactica (Sudafrica) v.19, p.315-318.

MARTINS, E.S.H. 1990. Contribuicao ao conhecimento sobre "Pudrición de Cogollo" PC de la palma africana en Colombia. EMBRAPA. Brasilia, D.F. 14 p. (Mimeografiado sin publicar)

MAZZOLINI, L; DAMBIER, Y.D.; DOLLET, M. 1990. Evidencia de una partícula de tipo viroide en la palma aceitera en el Ecuador y Brasil y su posible relación con la pudrición de cogollo. (PC). El Palmicultor (Colombia) No. 22, p.8.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park PA, USA. 193 p.

NIETO P., L.E.; GOMEZ, P. .L. 1991. Estado actual de la investigación sobre el complejo pudrición de cogollo de la palma de aceite en Colombia. Palmas (Colombia) v. 12; p. 57-67.

OCHOA, G; BUSTAMANTE, E. 1974. Investigación del agente causal de la pudrición de flecha en palma africana. Revista ICA (Colombia) v. 9. no. 4, p. 425-433.

RENARD, J.L. 1991. Pudrición de cogollo en el Ecuador. Palmas (Colombia) v. 12 no. 2, p. 31.

ROJAS P., E. 1972. Investigaciones sobre la enfermedad pudriciones de cogollo-pudrición de flecha de la palma africana en la plantación la Arenosa de Coldesa S.A. Estudios Agronómicos, Dirección Agroecológica. Instituto Agustín Codazzi, Bogotá. 65p. (Mimeografiado).

SANCHEZ P., A. 1967. Informe sobre el estado fitosanitario de algunas plantaciones de palma africana localizadas en el departamento del Meta (Zona de Acacias y Cumaral). Agricultura Tropical (Colombia) v. 23 no. 2, p. 78 - 87

TURNER, P.D. 1981. Oil palm diseases and disorders. Oxford University Press, Kuala Lumpur. 280p.



CORFIBOYACA S.A.
CORPORACION FINANCIERA DE BOYACA S.A.

BOGOTA	CALI	DUITAMA	SOGAMOSO
Dirección General Cra. 13 No. 27-47 Piso 6. Tels: 2859800 - 2857887	Oficina Norte Cra. 15 No. 92-62 Tel. 2573008	Cra. 3 No. 8-11 Tel: 8955470/73	Cra. 12 No. 11-65 Interior 15. Piso 2 Tel. 704144
Centro Internacional Cra. 13 No. 27-50 Interior 179 Tels: 2867806 - 2865978 A.A. 3146	TUNJA Calle 18 No. 11-22 Piso 3 Tel. 425260	Cra. 16 No. 14-68 Edificio Nápoles Oficina 203 Tels: 602428 605318	Centro Comercial Jubar