

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**1. TITULO**

**APOYO AL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN “CARACTERIZACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LA PUDRICIÓN HÚMEDA DEL ESTÍPITE DE LA PALMA DE ACEITE EN COLOMBIA”**

**2. RESUMEN EJECUTIVO**

El principal flagelo de la palmicultura colombiana son los problemas sanitarios que afectan diferentes órganos de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*). Este proyecto surge de la necesidad de conocer e identificar los microorganismos asociados a una de las pudriciones de estípite; denominada pudrición húmeda del estípite. Ésta es una enfermedad poco estudiada y en el sector muchos no la conocen o la asocian a otras problemáticas, por este motivo el Centro de Investigación de la Palma de aceite (Cenipalma) se vio en la necesidad de orientar investigaciones hacia la caracterización en campo de los síntomas asociados, muestreos de tejido para la obtención de los microorganismos asociados y la evaluación de la patogenicidad, para la identificación del agente causante de esta enfermedad. Este estudio servirá para ampliar el conocimiento de los palmicultores respecto a este problema sanitario, su agente causal y estrategias de manejo, los cuales se verán traducidos en una disminución de la incidencia y diseminación de la enfermedad en el campo, así como el mejoramiento de los rendimientos del cultivo.

Con el desarrollo de este trabajo se logró avanzar en el aislamiento de microorganismos y la selección preliminar de cepas con posibles características patogénicas, generando nuevas oportunidades para continuar con los procesos de investigación en torno a la determinación del agente causal de la enfermedad en Colombia.

**3. INTRODUCCIÓN**

En Colombia la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) es uno de los cultivos con mayor impacto económico y social, después del cultivo de café, actualmente supera las 500.000 hectáreas sembradas en 152 municipios de 21 departamentos; (Mesa, 2018) este cultivo oleaginoso lidera la producción mundial de aceites y grasas vegetales, siendo Colombia el cuarto país con mayor producción de aceite de palma en el mundo y el primero en América (Mesa, 2019).

Una de las mayores limitantes en este cultivo son los problemas fitosanitarios; enfermedades como la Pudrición del cogollo (PC), la Marchitez letal (ML) y la

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

Marchitez sorpresiva han afectado miles de hectáreas en Colombia y Latinoamérica. (Fedepalma, 2007). Sin embargo, se han registrado otras enfermedades que han impactado económicamente a los palmicultores como el anillo rojo y las pudriciones de estípite por el aumento en los costos de monitoreo y control (Mestizo et al., 2012). Dentro de las pudriciones de estípite reportadas se encuentran la pudrición basal causada por *Ganoderma boninense*, la pudrición alta del estípite por *Phellinus sp.*, y pudriciones seca, corchosa y húmeda asociadas a microorganismo como *Ceratocystis paradoxa*, *Kretzschmaria sp. (Ustulina)* y bacterias o toxinas respectivamente. Sin embargo, de éstas no se registran trabajos de investigación con pruebas de patogenicidad que respalden dichos reportes (Nieto, 1995).

En plantaciones de la Zona Central se viene presentado un incremento en los casos de pudriciones húmedas de estípite, de las cuales no se tiene identificado su agente causal. Por esta razón, se hace necesario desarrollar trabajos de investigación que permitan confirmar su agente causante y establecer estrategias de manejo y control del problema.

### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El registro de palmas afectadas por Pudrición húmeda de estípite (PHE) se ha dado principalmente en plantaciones de las zonas Oriental y Central Colombiana. Por muchos años se presentaron casos aislados, que fueron eliminados y no se consideraron problema. Sin embargo, a partir del año 2016 en plantaciones de la Zona Central el número de palmas que presentaron este problema se incrementó generando una alerta fitosanitaria en el sector palmicultor.

Las palmas de aceite (*E. guineensis*) afectadas se caracterizan por secamiento en las hojas de color rojizo con borde clorótico a naranja, que inicia en la punta de los folíolos y por lo general del ápice a la base de la hoja, los frutos e inflorescencias se pudren y el estípite empieza a perder consistencia. En estados avanzados las hojas se marchitan y finalmente se secan, el estípite se descompone en fibras de las que exudan líquidos de mal olor que atraen insectos por la fermentación. El desconocimiento del agente causal de este problema ha dificultado el establecimiento de estrategias de manejo, ocasionando el aumento de la incidencia generando pérdidas económicas a los palmicultores, debido a que, en los estados avanzados de la enfermedad, la única estrategia de manejo es la eliminación de la palma. Adicionalmente, por el tipo de pudrición en épocas lluviosas se disemina muy fácilmente y amenaza con expandirse a otros lotes y plantaciones vecinas. Por lo anterior, el Centro de investigación de palma de aceite Cenipalma, enfoca sus esfuerzos en el diagnóstico de esta enfermedad con el fin de iniciar la búsqueda de estrategias de manejo que permitan mitigar su impacto.

### 5. JUSTIFICACIÓN

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

Colombia se ha convertido en uno de los principales países de producción de palma de aceite (*E. guineensis*), ocupando el cuarto puesto a nivel mundial, siendo el segundo cultivo permanente con mayor extensión en área sembrada, pues ya supera las 530.000 hectáreas. Su importancia económica debido a la producción de aceite lo ubica en el segundo producto más importante en Colombia después del café siendo ambos cultivos permanentes, postulado de sexto en la generación de valor en el sector agrícola. (Mesa,2018; SISPA,2019)

Aportando a la comunidad de su alrededor unos 170.000 trabajos, en forma directa e indirecta con las plantaciones, extractoras, campos de investigación y otros oficios, ofreciendo una mejor calidad de vida a grupos de personas ubicadas en zonas rurales donde opera la agroindustria, cifras del DANE y Fedepalma (Mesa, 2018; SISPA, 2019). Sin embargo, las enfermedades presentes y la aparición de nuevos problemas sanitarios generan grandes pérdidas económicas a los palmicultores. Las pudriciones del estípite de la palma de aceite (*E.guineensis*) hacen parte de las enfermedades emergentes del cultivo, entre estas la pudrición húmeda, que hasta el momento no ha sido descrita ni identificada, por lo cual se hace necesario adelantar estudios que contribuyan a la identificación de los síntomas externos e internos, así como la identificación de su agente causante en Colombia. Lo anterior, contribuirá en el establecimiento de medidas de manejo que conlleven a una disminución de la incidencia y diseminación de la enfermedad, que a su vez se traducirán en el mejoramiento del rendimiento del cultivo.

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo general.

Apoyar en protocolo de investigación titulado “Identificación de los microorganismos asociados a la Pudrición húmeda del estípite en palma de aceite”.

### Objetivos específicos.

Aislar y purificar microorganismos obtenidos a partir de tejidos afectados por la Pudrición húmeda del estípite en la palma de aceite (*E. guineensis*)

Caracterizar los microorganismos obtenidos a partir de tejidos afectados por Pudrición húmeda del estípite en palma de aceite (*E. guineensis*).

Evaluar en condiciones de laboratorio y campo la capacidad patogénica de los microorganismos aislados.

## 7. MARCO REFERENCIAL

La palma de aceite da inicios en el Golfo de Guinea en el África Occidental, botánicamente recibe nombre científico de *Elaeis guineensis* dado por Jacquin en 1763, debido al griego elain que significa aceite y guineensis, en conmemoración de Guinea donde se originó (Borrero, 2006; Mujica et ál., 2010). Ingreso a América Tropical por

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

medio de los comerciantes de esclavos y los colonizadores; en el año 1848, la palma de aceite ingresa a Asia por medio de Java dando inicio a la expansión de esta en el mundo y en 1932, Florentino Claes, dio paso a la palma de aceite en Colombia siendo sembradas con fines ornamentales y en el año 1945 se establece el primer cultivo de palma de aceite con una visión comercial, todo esto gracias a United Fruit Company en el departamento de Magdalena (Borrero, 2006).



**Figura 1.** Plantación de palma de aceite (fotografía: Flickr- Hans Van Der Wal). 2016

### Características de la palma de aceite.

La palma de aceite es una planta tropical propia de climas cálidos, se desarrolla hasta los 500 metros sobre el nivel del mar. Dentro de los cultivos de semillas oleaginosas es el que produce mayor cantidad de aceite por hectárea y otras de sus características son:

- Nombre científico: *Elaeis guineensis* Jacq
- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Liliopsida*
- Subclase: *Commelinidae*
- Orden: *arecales*
- Familia: *Arecaceales*
- Subfamilia: *Coryphoideae*
- Género: *Elaeis*
- Especie: *Elaeis guineensis* Jacq
- Tiene 16 pares de cromosomas.
- Es una planta monocotiledónea (Su semilla tiene un solo Cotiledón o almendra)

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

- Es una planta Monoica (las flores femeninas y masculinas, se producen independientes, en una misma planta)
- Es alógama pues su reproducción es cruzada.
- Es una planta perenne.

(Fedepalma y Minambiente, 2002)

### Requerimientos del cultivo.

- **Altitud(msnm):** el rango optimo es de 0 hasta 1000.
- **Temperatura:** en promedio de 25 a 30 °C; demostrando en estudios que a 15°C se inhibe el crecimiento de la planta de vivero y que a 20°C el crecimiento es 3 veces más rápido.
- **Precipitación anual:** para que la palma se desarrolle en condiciones óptimas deben caer entre 2.000 y 4.000(m.m); es decir que en el mes debe disponer de 150 milímetros.
- **Brillo solar:** debe ser mayor a 2000(horas de luz directa mínimo anual)
- **Humedad relativa:** esta debe oscilar entre 75-80%.
- **Velocidad del viento.** Con el fin de evitar volcamiento a cualquier edad de la palma el viento debe correr menor a 30 Km/hora. (Fedepalma, 2007; Fedepalma, 2010.)

Esta planta es propia de regiones tropicales húmedas, con altas temperaturas, brillo solar y suficiente humedad, posee una capacidad de adaptación a una amplia variedad de suelos, se ven beneficios cuando se siembra en suelos profundos, fértiles, bien drenados y con abundante materia orgánica (Vargas, 2016).

### Pudrición húmeda del estípite

La palma es afectada por diferentes problemas sanitarios, entre los que se encuentran las Pudriciones de estípite destacando Pudriciones húmedas, secas, corchosas y la más importante por su agresividad, la Pudrición basal del estípite (PBE), señalada como la enfermedad más devastadora e importante económicamente en Malasia e Indonesia donde se registra el 50% al 80% de la muerte de las palmas a mitad de su vida productiva (Gurmit, 1995).

En Colombia los diferentes tipos de Pudrición de Estípite inicialmente no eran discriminadas adecuadamente por la falta de conocimiento acerca las características sintomatológicas de cada una (Nieto, 1994). A raíz de esto Cenipalma estructuró un proyecto de investigación para conocer la distribución e importancia económica de estas enfermedades en Colombia y para establecer los síntomas y signos que facilitarían el manejo del problema (Tovar y Nieto, 1998).

La causa de la Pudrición húmeda de estípite se desconoce, hay registros de bacterias asociadas al problema, pero no hay trabajos de investigación que presenten el

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

diagnóstico completo. El síntoma más característico de la enfermedad es una pudrición húmeda con olor a fermento muy fuerte, presencia de exudados viscosos, color café claro en el estípite y un color amarillo en las zonas de avance de las lesiones (Turner, 1981; Rodríguez, 2001; Fernández, 2009). Inicialmente los tejidos vasculares se aprecian como fibras de color amarillo brillante, debido a que están principalmente compuestos de celulosas, lo que los hace difícil de degradar, en estado más avanzado de la enfermedad se tornan de color

claro (Nieto, 1995). Debido a las características descritas anteriormente, algunos investigadores como Turner (1981) y Nieto (1994) la asocian a bacterias.

Esta enfermedad se ha registrado afectando palmas entre los tres y los cinco años, sin embargo, también puede afectar palmas de más de diez años (Pineda y Martínez, 2013).

Dentro de los microorganismos asociados a pudriciones blandas de este tipo y que causan graves daños en los órganos carnosos de las plantas se relacionan bacterias del grupo *Erwinia carotovora* (*E.c*), entre ellas *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) y *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) (Hens et al. 2006). Otros géneros de bacterias como en el caso de *Pseudomonas* también ocasionan este tipo de pudriciones, pero en menor medida que las bacterias del género *Erwinia* (Agrios, 2005).

Además de las bacterias, los hongos también producen este tipo de afectaciones en plantas, como es el caso de los basidiomicetos, los cuales poseen varias especies de importancia, entre las que se encuentran *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes trogii*, las cuales tienen la capacidad de degradar los componentes de la madera (*Lignina, celulosa y hemicelulosa*). Otras especies ajenas a los Basidiomicetos también producen este tipo de patologías, entre ellas, *Fomes annosus* y *Phellinus andinopatagonicus*.

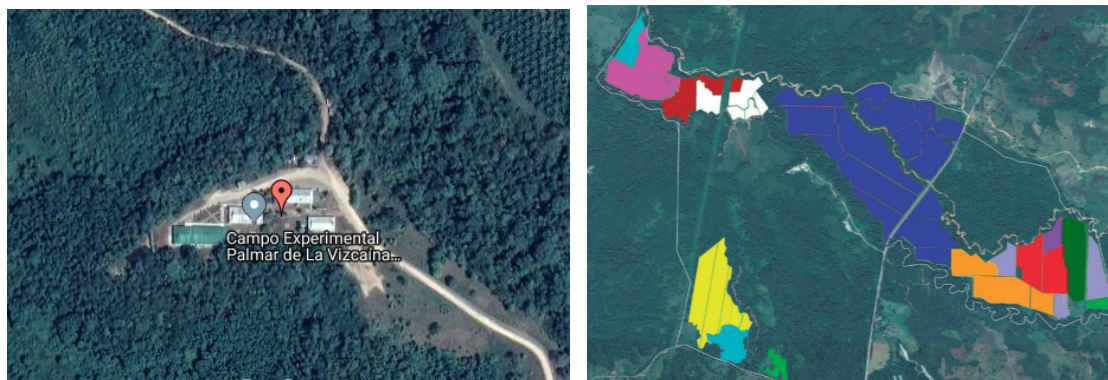
Es importante mencionar que este tipo de problemas fitosanitarios de los que se desconoce la causa requieren de trabajos que permitan verificar la presencia de patógenos asociados y de la confirmación de su patogenicidad asociada a los síntomas observados en campo (Postulados de Koch) e investigación científica que permita su caracterización e identificación (Pineda y Martínez, 2013).

## 8. MATERIALES Y METODOS

**Ubicación:** Las muestras de este trabajo fueron tomadas en los primeros meses del año 2018; en plantaciones de la Zona Central palmera de Colombia, que reportaron casos de Pudrición húmeda del estípite. La Zona Central cubre los municipios de: Sur de Santander, Yondó, Puerto Wilches, Sabana de Torres, San Alberto, San Martín, Rio de Oro (Cesar), Aguachica, Gamarra, La Gloria, Pelaya (Cesar), Norte de Santander y Sur de Bolívar.

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

El procesamiento de muestras y el análisis de los microorganismos obtenidos; se realizó en el laboratorio de Cenipalma ubicado en el Campo Experimental La Vizcaína, ubicado en la vereda Peroles, del municipio de Barrancabermeja, Santander a una latitud de 6°58'57" N y una longitud de 73°4'43" O y 110 msnm, en el kilómetro 132 sobre la troncal del Magdalena Medio en la vía Lizama - Puerto Araujo. (Figura 2)



**Figura 2.** Ubicación aérea del campo experimental palmar la Vizcaína. (Google maps, 2019)

**Tabla 1.** Materiales para toma de muestras

Tubos Corning.	Cinta de enmascarar
Porta cuchillas.	Cuchillo
Cuchillas para bisturí.	Desinfectante.
Podadoras.	Bolsas Ziploc
Palín	Marcadores y Esferos.
Cinta de enmascarar	Geles refrigerantes
Nevera de icopor (portable)	Agenda.

**Tabla 2** Materiales necesarios para análisis de muestras.

Cámara de flujo laminar.	Alcohol al 70% y 90%
Microscopio.	Cajas de Petri.
Autoclave	Azas.
Reactivos.	Pinzas.
Medios de cultivo.	Micro pipetas.
Linterna de luz violeta.	Rastrillo
Bandejas.	Guantes y Tapabocas.
Hipoclorito.	Vinipel.
Tubos de ensayo.	Laminas.

### Toma de muestras.

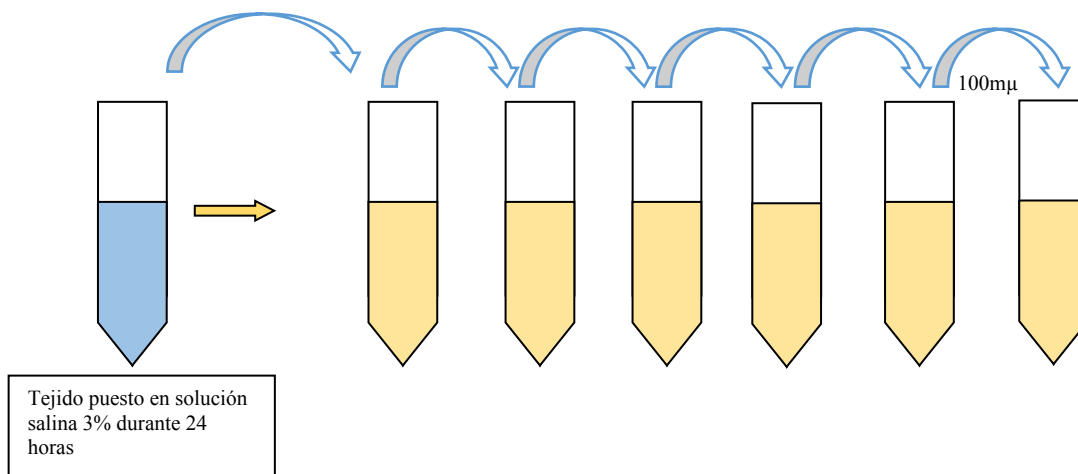
La toma de muestras se realizó en plantaciones de la Zona que registraron casos de Pudrición húmeda del estípite (PHE), en estas palmas se verificaron los síntomas

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

presentes y luego se procedió a la eliminación y disección. Posteriormente, se tomaron trozos del estípite en la zona de avance del daño y se dispusieron en tubos Corning que fueron sellados y rotulados con la información de origen, igualmente se tomaron muestras de la zona de avance de otros órganos como primordios foliares, inflorescencia y pedúnculos. Estos tubos con los tejidos fueron refrigerados y transportados hasta el laboratorio de Fitopatología de Cenipalma del CEPV.

### Procesamiento de muestras.

Los tejidos recolectados fueron cortados en trozos pequeños y desinfectados con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 1% durante 30 segundos en cada proceso, posteriormente, unos trozos se dispusieron en solución salina al 3 % durante 24 horas y los demás se sembraron en medios para hongos basidiomicetos como Agar extracto de Malta y GSM. Pasadas las 24 horas en solución salina se realizaron diluciones seriadas de la suspensión ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) (Figura 2). A continuación, se dispusieron 30 $\mu$ l a partir de la dilución  $10^{-3}$  en medios para bacterias que producen pudriciones blandas (YDC “levadura-dextrosa-carbonato de calcio”, King B y Agar nutriente) (Figura 3). Las cajas se incubaron de 27 a 30°C durante 3 días, a partir de allí se seleccionaron colonias de morfología diferente que luego fueron transferidas a una nueva caja con medio de cultivo para su purificación.



**Figura 3.** Diluciones seriadas para la obtención de unidades formadoras de colonia en medio de cultivo artificial.

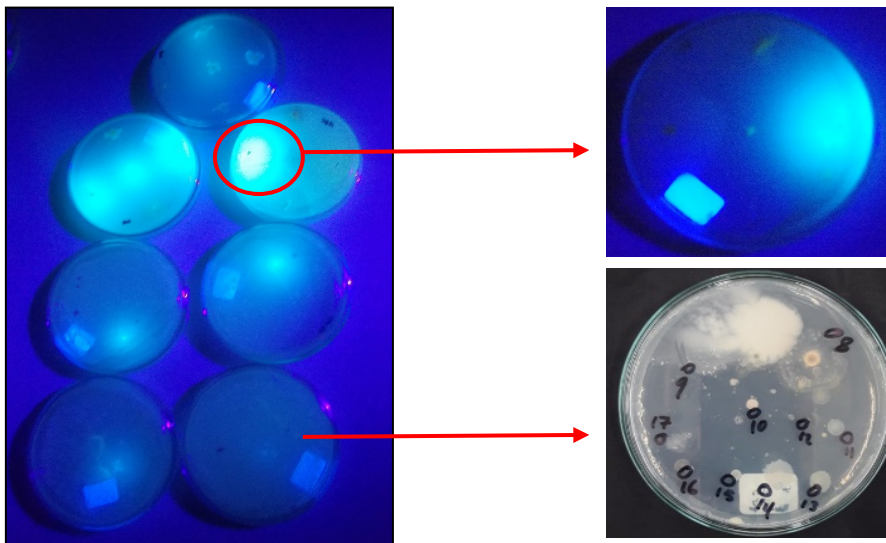


**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Figura 4.** Medios para bacterias empleados en el trabajo.

**Selección de microorganismos.**

Para la selección de microorganismos se marcaron las colonias presentes en las cajas Petri que presentaron morfología diferente y las que a través de una lámpara de luz negra generaron fluorescencia, esto se realizó visualmente y con la ayuda de un estereoscopio (Figura 4). Igualmente, se realizó un registro teniendo en cuenta aquellas colonias más frecuentes, las cuales fueron purificadas y conservadas para los siguientes estudios.



**Figura 5.** Selección y enumeración de las unidades formadoras de colonia

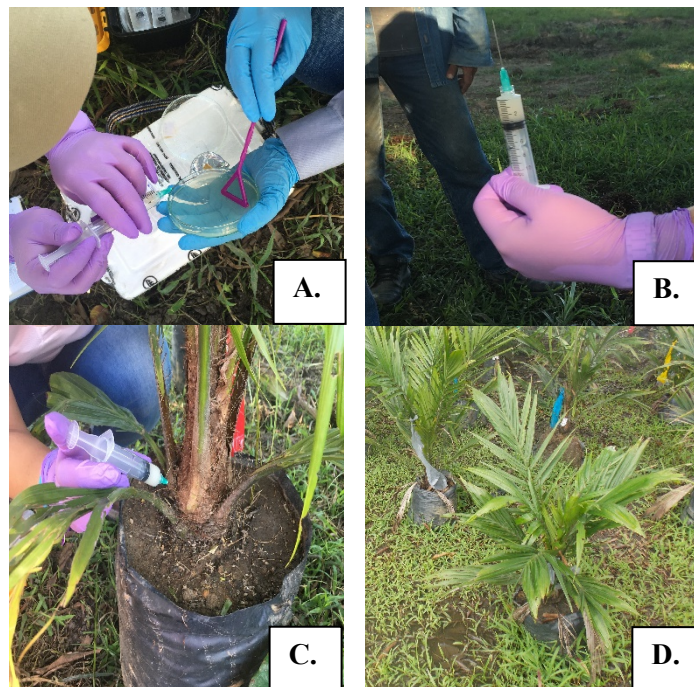
**Pruebas de patogenicidad en tejido desprendido**

En campo se seleccionaron pecíolos provenientes de palmas sanas y se llevaron al laboratorio, se desinfectaron con hipoclorito al 2%, estos se cortaron en trozos de 5cm y se sellaron con parafina los extremos expuestos, posteriormente se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se les realizó una perforación con broca calibre 3/8 de 1,5 a 2cm de profundidad, en sentido vertical. Se tomaron las cajas con bacterias de 24 horas de crecimiento, se preparó una suspensión bacteriana de turbidez N°6 según la Escala McFarland que corresponde a una concentración aproximada de  $18 \times 10^8$  UFC/ml, de esta suspensión en cada orificio se depositaron 600µl. Posteriormente, los orificios fueron sellados con la ayuda de Parafilm y los pecíolos inoculados se almacenaron en bandejas a temperatura ambiente del laboratorio (26-28°C aproximadamente).

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

### Pruebas en campo.

Este experimento se realizó con las colonias que presentaron desarrollo de lesiones de tipo acuoso en la prueba de tejido desprendido, obtenidas de la plantación “El Paraíso” ubicado en el sector Bajo Simacota del Municipio de Simacota, Departamento de Santander. La prueba fue llevada a cabo sobre plantas sanas de vivero de 9 meses y se estableció en la plantación para garantizar se contará con las mismas condiciones agroclimatológicas donde se presentó el problema. Para esto, se realizó un orificio de aproximadamente 2cm de profundidad en la base de bulbo de la planta con la ayuda de una puntilla de 1 pulgada esterilizada previamente. Allí se depositaron 1.5 ml de una suspensión de turbidez N°6 según Escala McFarland que corresponde a una concentración aproximada de  $18 \times 10^8$  UFC/ml (Figura 5)



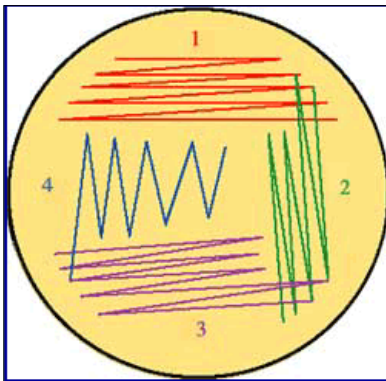
**Figura 6.** Inoculación en palmas de vivero. **A.** Preparación de inóculo; **B.** Dosis por palma; **C.** Inoculación en el orificio realizado; **D.** Planta inoculada

Para la evaluación de la prueba se realizaron observaciones semanales del estado visual de las mismas.

### Identificación de bacterias.

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

Se clasificaron a partir de colonias puras, teniendo en cuenta la morfología de las colonias, tinción de Gram, pruebas específicas tales como: pruebas bioquímicas y crecimientos en medios diferenciales. Todos los aislamientos obtenidos se purificaron rayando cajas de agar nutriente a través de la técnica de agotamiento (Fig.7) y se almacenaron en condiciones de laboratorio 26°C.



**Figura 7.** Esquema del método de agotamiento.

Dependiendo de los resultados de la tinción de Gram, se realizarán pruebas bioquímicas específicas para su identificación inicial.

### Pruebas bioquímicas.

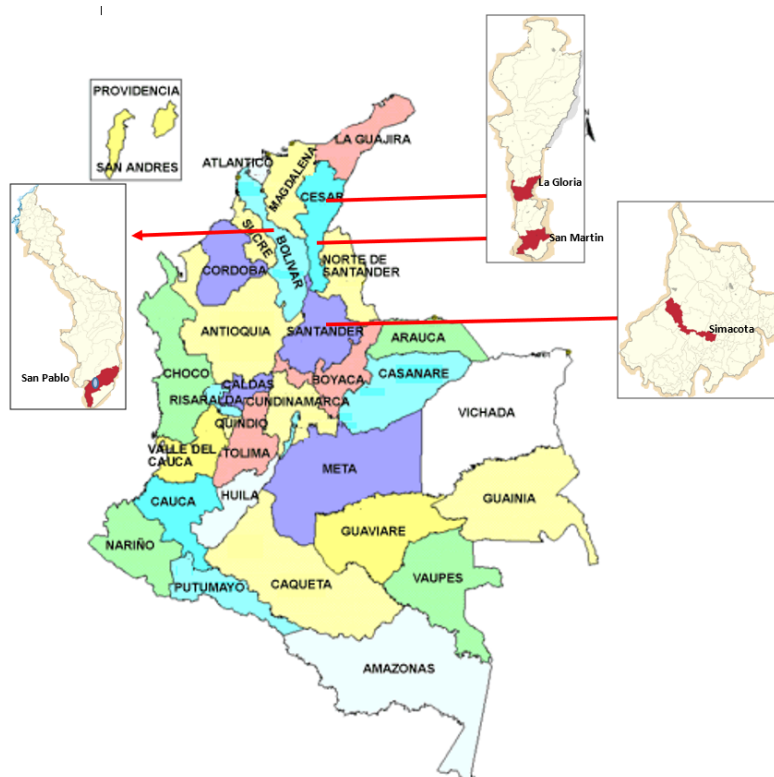
- Fluorescencia en medio King B. Esta prueba permite identificar bacterias del género *Pseudomonas*.
- Prueba de reducción de nitratos esta prueba permite distinguir grupos importantes de bacterias por ejemplo *Xanthomonas* que no son capaces de reducir nitratos
- Prueba de KOH
- Fermentación de carbohidratos (Hugh y Leifson)
- Capacidad para descomponer compuestos nitrogenados y producción de ácido sulfhídrico (T.S.I),
- Capacidad para la producción de Indol
- Producción de urea y capacidad de descomponer macromoléculas en test de licuefacción de gelatina.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSION.

### Toma de muestras

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

La toma de muestras se realizó en cuatro plantaciones de la Zona Central que registraron el problema, ubicadas en tres departamentos: Cesar, Bolívar y Santander (Figura 8, Tabla 3).



**Figura 8.** Ubicación toma de muestras de palmas afectadas con posible (P.H.E)

**Tabla 3.** Ubicación de las muestras

Plantación	Dpto.	Municipio	Material	Año de siembra	# Palmas muestreadas
Las Palmitas	Cesar	San Martín	CIRAD 0704	2016	1
Palmeras el Paraíso	Santander	Simacota	CIRAD 7001	2015	3
Los Pinos	Bolívar	San Pablo	Unilever	2013	4
Hda. la Gloria	Cesar	La Gloria	Dami las Flores	2009	2

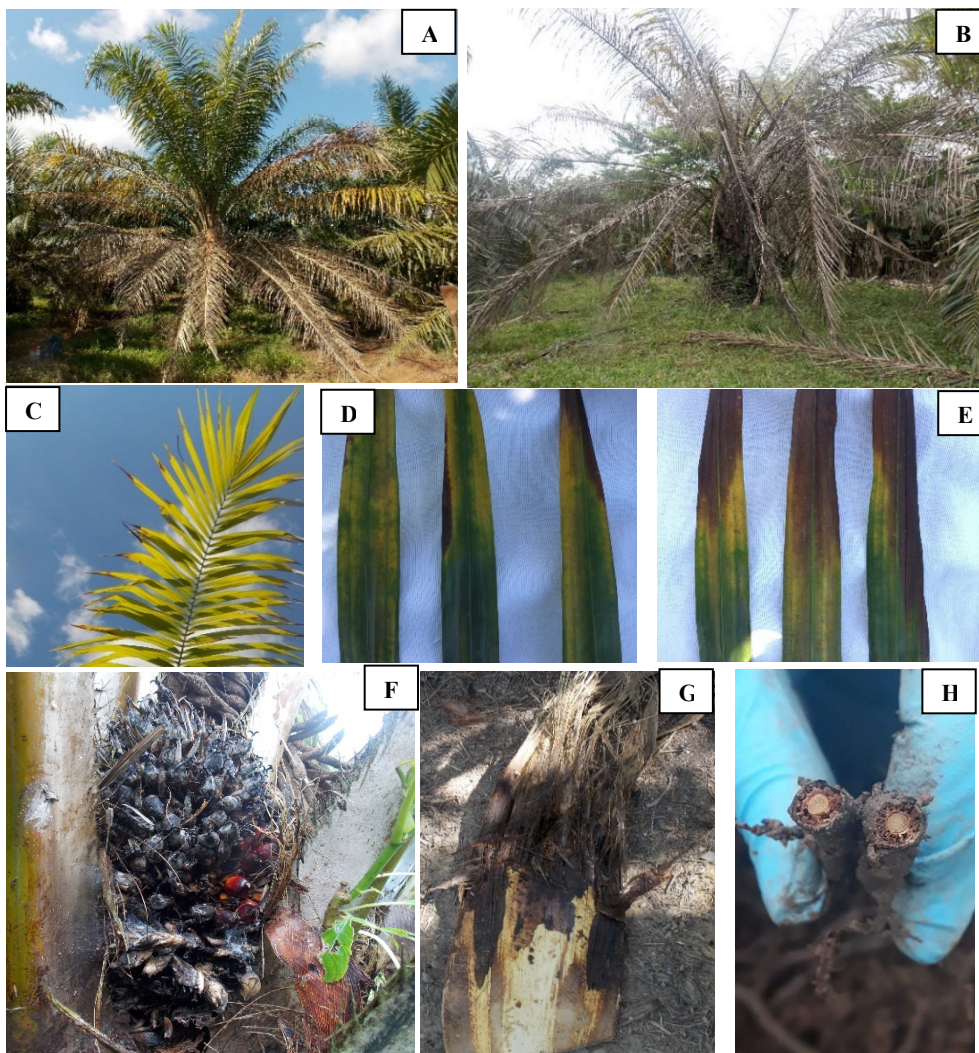
Los síntomas observados en todas las plantaciones visitadas fueron: Marchitez en las hojas de color rojizo, acompañado de una franja amarilla, posterior necrosis y entorchamiento de los bordes; las raíces se secan y toman una coloración rojiza y los racimos e inflorescencias se pudren (Figura 9). La Marchitez tiende a ser ordenada y ascendente, aunque en algunos casos la distribución se acentúa más sobre el

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

costado en que inicia el daño en el estípite. El desarrollo de la lesión en foliolos, aunque inicia en el ápice muestra una distribución desordenada a lo largo de su superficie.

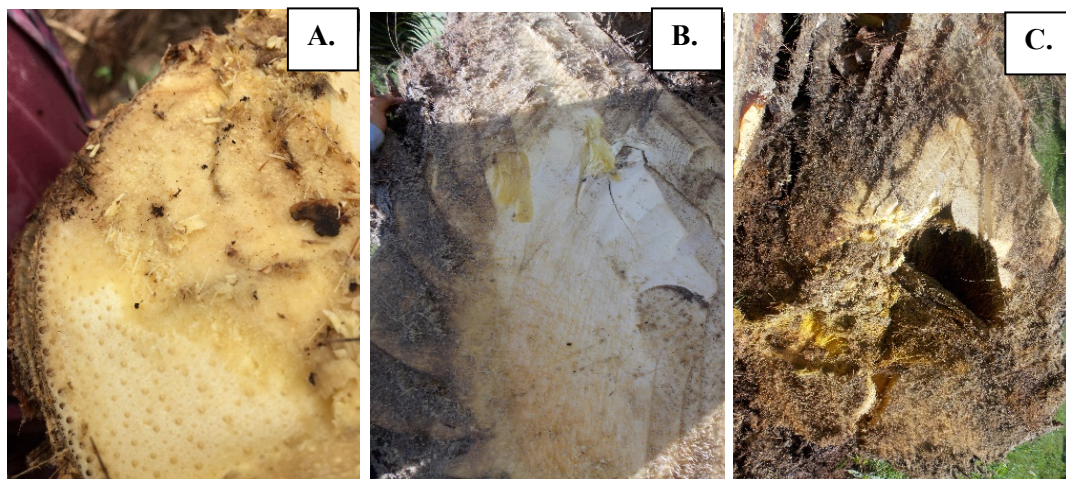
En estados iniciales el estípite empieza a perder consistencia por lo que se torna más blando y fácil de cortar, algo que se dificulta en una palma sana y a medida que va avanzado este se descompone en fibras de las que exudan líquidos de mal olor (Figura 9).

Estos resultados coinciden con los reportados por Pineda y Martínez (2013), quienes registran que las palmas afectadas por este problema presentan una coloración en las hojas de color amarillo opaco, estas luego se marchitan y mueren, los racimos e inflorescencias se pudren y al cortar el estípite es posible observar una descomposición y humedad de olor fétido. De la descomposición quedan los haces fibrovasculares conformando un tejido de aspecto esponjoso y los demás tejidos presentan una degradación de aspecto mucoso. Igualmente, autores como Turner (1981), Rodríguez (2001), y Fernández (2009), reportan una sintomatología similar para este problema.



**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Figura 9.** Síntomas PHE. **A.** secamiento foliar ascendente; **B.** Secamiento total de la palma; **C, D, E.** secamiento en foliolos; **F.** Pudrición de frutos; **G.** Pudrición de inflorescencias inmaduras; **H.** Pudrición en la raíz. (Barreto, 2019)



**Figura 10.** Síntomas internos. **A.** daño en base peciolar; **B y C.** Daño en el estípote (Barreto,2019)

**Muestras procesadas.**

De las palmas enfermas se tomaron muestras de la zona de avance de la lesión en el estípote, bases peciolares y raíz, luego de ser desinfectadas y sembradas en los cuatro medios seleccionados (tres cajas de medio por dilución- 48 cajas/muestra) se incubaron y 48 horas después se realizó la cuantificación de colonias bacteriana por caja, obteniendo los siguientes resultados:


**Tabla 4.** Muestras seleccionas y número de colonias totales por muestra plantación las Palmitas (San Martin- Cesar)

<b>Las Palmitas</b>		
	<b>Tipo de tejido procesado</b>	<b>Colonias (cantidad/palma)</b>
	Estípote con lesión	96
	Estípote con avance de lesión	86
	Bases Peciolares	78
	Raíces	115
	<b>Total Colonias</b>	<b>375</b>

Facultad de Ciencias Agropecuarias

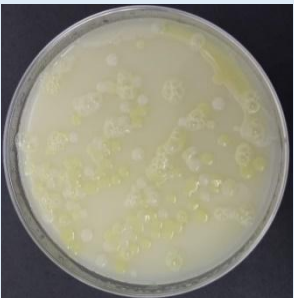
**Tabla 5.** Muestras seleccionas y número de UFC totales por muestra plantación El Paraíso (Simacota- Santander)

<b>Palmeras el Paraíso</b>	
<b>Tipo de tejido procesado</b>	<b>Colonia (cantidad/palma)</b>
Estípite con lesión	76
Estípite con avance de lesión	83
Bases Peciolares	38
<b>Total Colonias</b>	<b>197</b>



**Tabla 6.** Muestras seleccionas y número de UFC totales por muestra plantación El Paraíso (Simacota- Santander)


<b>Los Pinos</b>	
<b>Tipo de tejido procesado</b>	<b>Colonia (cantidad/palma)</b>
Estípite con lesión	154
Estípite con avance de lesión	98
Bases Peciolares	39
Raíces	110
<b>Total Colonias</b>	<b>401</b>



**Tabla 7.** Muestras seleccionas y número de UFC totales por muestra plantación Hacienda la Gloria (La Gloria- Cesar)

<b>Hacienda La Gloria</b>	
<b>Tipo de tejido procesado</b>	<b>Colonia (cantidad/palma)</b>
Estípite con lesión	95

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

	Estípites con avance de lesión	50
	Bases Peciolares	18
	Raíces	83
	<b>Total Colonias</b>	<b>246</b>

**Selección de microorganismos**

Luego de la cuantificación, se hizo una selección de colonias de las cajas teniendo en cuenta característica macroscópicas como: color (blanca, amarilla, roja, crema), forma (puntiforme, circular, filamentosa, rizoide o irregular) textura (Lisa, rugosa), apariencia (mucoide, brillante o opalescente) estas colonias fueron aisladas y purificadas obteniendo:

**Tabla 8.** Número de Colonias diferentes por muestra

<b>Plantación</b>	<b>Palma</b>	<b># Colonias</b>
Las palmitas	1	11
Paraíso	1	3
Paraíso	2	4
Paraíso	3	2
Los Pinos	1	7
Los Pinos	2	5
Los Pinos	3	6
Los Pinos	4	3
Hacienda La Gloria	1	6
Hacienda La Gloria	2	5

**Pruebas patogénicas en tejidos desprendidos.**

Las colonias seleccionadas de cada una de las plantaciones se inocularon en 4 trozos de peciolos de palma (órgano afectado por la enfermedad), con el fin de realizar una selección rápida de las colonias obtenidas, esto sustentado bajo lo registrado por Agrios 2005, quien afirma que las pruebas de patogenicidad *in vitro* facilitan la detección de un agente infeccioso gracias a la rapidez con que se pueden observar sus efectos.

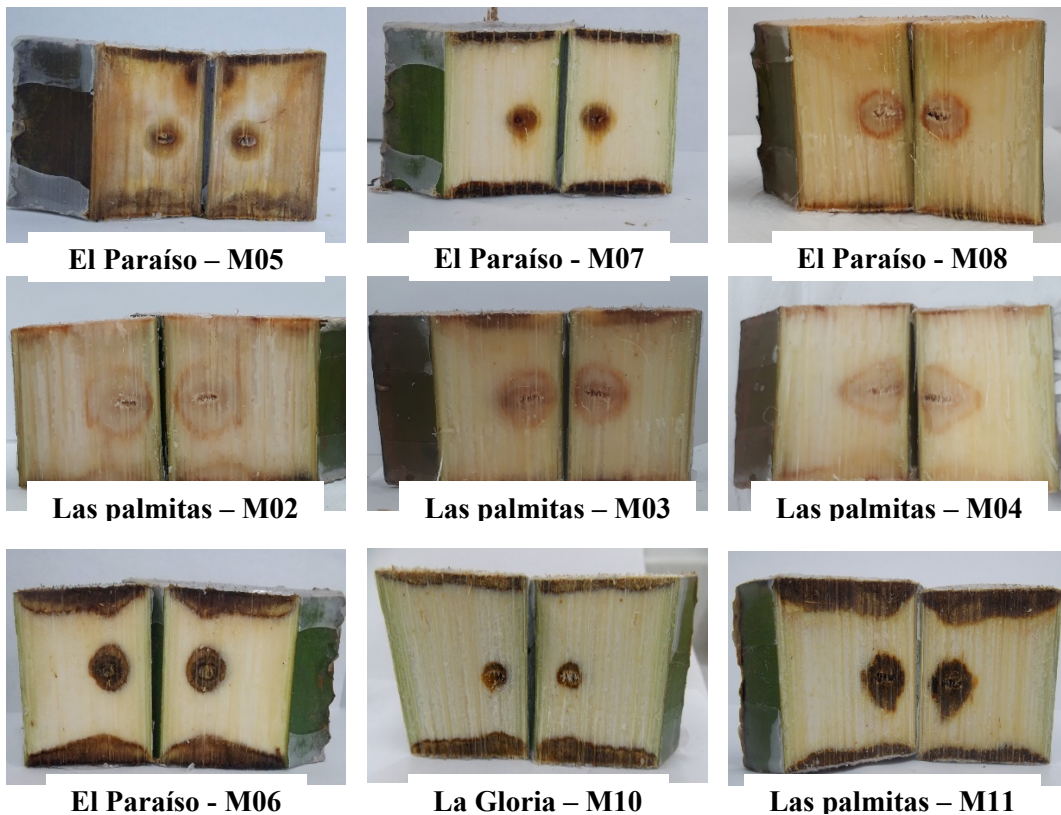
Con seis de los diferentes morfotipos inoculados se logró reproducir pudrición húmeda con halo de avance en los peciolos. Tres de las bacterias correspondían a los morfotipos obtenidos en la plantación el Paraíso y tres a las Palmitas tal y como se muestra en la Tabla 8 y la Figura 10.

**Tabla 9.** Bacterias con capacidad patogénica por plantación

<b>Cantidad de Colonias positivas por plantación</b>	
Las palmitas.	3

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Paraíso	3
Los pinos	0
Hacienda La Gloria	0



**Figura 11.** Lesiones generadas en peciolo de palma inoculados

El testigo no registró ningún daño acuoso, solo una coloración parda producto de la reacción del tejido a la herida realizada por el taladro, igualmente se observan estas coloraciones en los extremos producto del sellado que se realiza con la parafina y esto sucede también en los tratamientos de inoculación con las bacterias.

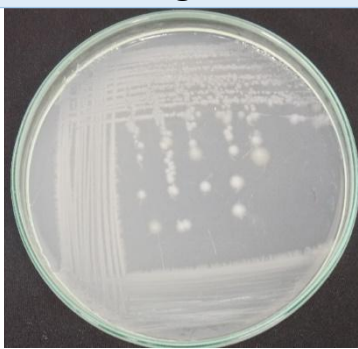
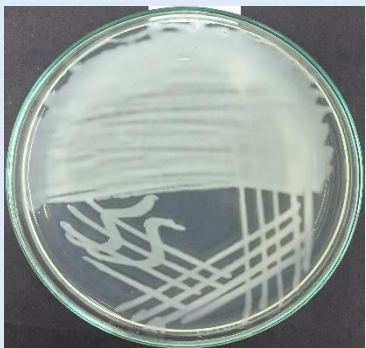
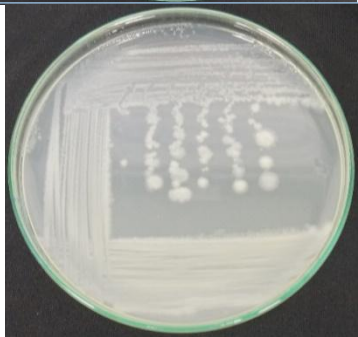


Facultad de Ciencias Agropecuarias

**Descripción morfológica de las colonias bacterianas.**

Se realizó la descripción de las 6 colonias bacterianas que generaron lesión en peciolo, estas fueron codificadas antecediendo el CP (Cenipalma), B (Bacteria), ZC (Zona Central) y por último se colocó en número de la muestra (Tabla 10). Estas mismas bacterias fueron usadas para realizar las pruebas bioquímicas.

**Tabla 10.** Descripción macroscópica de las colonias de interés

Descripción de colonias seleccionadas		
Características	Fotografía	Código
<p>Colonia de tamaño mediano, con forma irregular, borde ondulado, superficie contorneada y plana, su consistencia es blanda, con aspecto cremoso, color crema, olor amoniacal y crecimiento moderado.</p>		<p>CPBZC-07</p>
<p>Colonia de forma irregular, borde ondulado, superficie contorneada sin elevación, su consistencia es blanda, con aspecto cremoso, olor fétido, crecimiento moderado.</p>		<p>CPBZC03</p>
<p>Colonia de forma irregular, borde ondulado, superficie contorneada sin elevación, su consistencia es blanda, color blanco a crema y de aspecto cremoso, crecimiento moderado.</p>		<p>CPBZC04</p>
		<p>CPBZC08</p>

Figura

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

<p>Colonia mediana, de forma rizoide, borde aserrado, superficie contorneada sin elevación, su consistencia es blanda, con aspecto cremoso, olor amoniacal, crecimiento moderado. Bajo luz negra se observa fluorescencia.</p>		
<p>Colonia puntiforme mediana, de borde entero superficie lisa, con una elevación convexa baja, consistencia blanda, aspecto cremoso, color blanco y crecimiento moderado.</p>		CPZC02
<p>Colonia de tamaño mediano, de forma irregular, con borde aserrado, en elevación plana, consistencia dura, aspecto aterciopelado, color crema y crecimiento escaso.</p>		CPZC05

Con cuatro bacterias de la plantación el Paraíso, se estableció una prueba preliminar de patogenicidad, tres que presentaron lesión acuosa en peciolo (CPBZCM5, CPBZCM7 y CPBZCM8) y una que no registro daño (CPBZC06). Se inocularon 6 palmas por cada una de las colonias bacterianas, haciendo una herida con una puntilla de 1" e introduciendo un 1ml de una suspensión realizada a partir de colonias de 24 horas de crecimiento.

Para esto se usó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 6 repeticiones, la unida experimental correspondió a una planta inoculada (Figura 13).

Facultad de Ciencias Agropecuarias

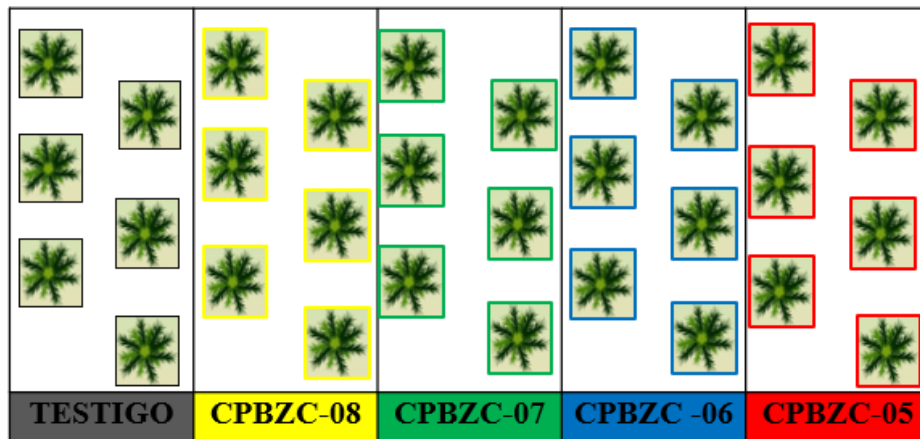


Figura 13. Diseño del experimento

Quince días después de la inoculación se observaron síntomas en una de las palmas inoculadas con la bacteria codificada como CPBZC-08, esta palma registró secamiento de hojas bajas, las hojas del segundo anillo y parte del tercero presentaron secamiento de la punta de los folíolos acompañado de una coloración marrón rojiza y precedida de una franja de color amarillo fuerte. La mayoría de las hojas se tornaron cloróticas (Figura 14). 60 días después de dispuesta la prueba preliminar de patogenicidad en campo, se realizó una re-inoculación haciendo una nueva herida con la ayuda de un taladro y una broca de 1"; para esto se usó una suspensión realizada a partir de colonias de 24 horas de crecimiento. Sin embargo, no se registran síntomas de la enfermedad en las palmas inoculadas (Figura 16).



Figura 14. Síntomas en hojas planta inoculada con la bacteria CPBZC-08

Facultad de Ciencias Agropecuarias



Figura 15. Prueba 30 días después de la inoculación



Figura 16. Prueba 108 días después de la inoculación

**Pruebas bioquímicas.**

De las bacterias a las cuales se les realizó pruebas bioquímicas se encontraron 3 Gram negativas y 3 Gram positivas y esto fue corroborado con la prueba de KOH. Para el peróxido o catalasa cinco arrojaron resultados positivos y una negativa (Tabla 11).

**Tabla 11.** Pruebas bioquímicas

Bacterias codificadas.	KOH 3%		Catalasa		Tinción de Gram	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
CPBZC-02	X		X			X
CPBZC-03		X		X	X	
CPBZC-04		X	X		X	
CPBZC-05	X		X			X
CPBZC-07		X	X		X	
CPBZC-08	X		X			X

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

Al finalizar este trabajo solo se alcanzaron a realizar pruebas de Hugh leifson, Indol y Gelatinasa con 3 colonias bacterianas de interés, obteniendo los siguientes resultados:

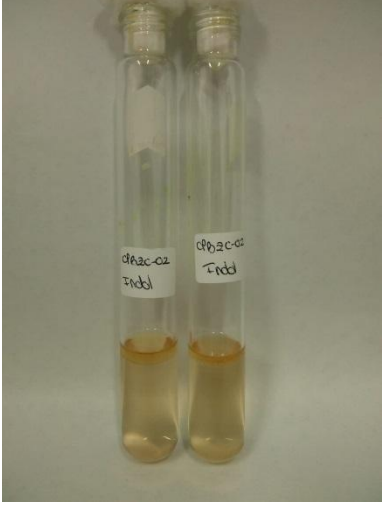
**Tabla 12.** Prueba de oxidación- fermentación (OF) de Hugh Leifson

Bacteria	Fotografía	Resultados
CPBZC-02		Fermentación de hidrato de carbono
CPBZC-05		Oxidación de hidrato de carbono.
CPBZC-08		Oxidación del hidrato de carbono



Facultad de Ciencias Agropecuarias



**Tabla 13.** Prueba de indol



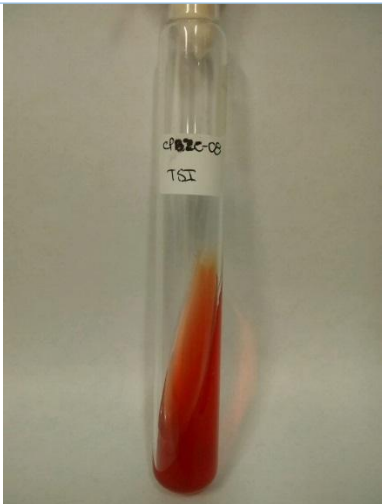
Bacteria	Fotografía	Resultados
CPBZC-02		NEGATIVO
CPBZC-05		NEGATIVO

Facultad de Ciencias Agropecuarias

		
CPBZC-08		NEGATIVO

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Tabla 14. Prueba Agar triple azúcar hierro (TSI)

Bacteria	Fotografía	Resultados
CPBZC-02		K/K H <sub>2</sub> S (-) GAS (-)
CPBZC-05		K/K H <sub>2</sub> S (-) GAS (-)
CPBZC-08		K/K H <sub>2</sub> S (-) GAS (-)

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Tabla 15. Prueba de la Gelatinasa

Bacteria	Fotografía	resultado
CPBZC-02		NEGATIVA
CPBZC-05		POSITIVA
CPBZC-08		POSITIVA

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

### Discusión de resultados

Los resultados obtenidos en los diferentes muestreos realizados arrojan que la totalidad de microorganismos aislados pertenecen al dominio bacteria. Las bacterias tienen la capacidad de infectar a través de lenticelas o heridas, y son favorecidas por condiciones húmedas en el campo, en la cosecha y durante el almacenamiento y el transporte poscosecha.

Las pudriciones blandas producidas por bacterias en su mayoría son reportadas por especies de los géneros *Erwinia* y *Pseudomonas* (Agrios, 2005; Peña y Páez, 2019). Estas pudriciones se presentan cuando hay separación de las células por lisis, lo que produce un colapso del tejido y este permanece blando y húmedo (Garcés et al., 1996; Agrios, 2005). En estados avanzados los tejidos se licuan desprendiendo olor fétido debido a las sustancias volátiles que liberan estos microorganismos, los tejidos se ablandan y vuelven acuosos y es frecuente que exuden masas mucilaginosas de bacterias (Agrios, 2005). Este tipo de pudrición es semejante a la encontrada en las diferentes plantaciones visitadas.

Las pruebas bioquímicas, medios diferenciales y Tinción de Gram permitieron una posible clasificación, donde el 50% de bacterias fueron bacilos Gram negativos, encontrándose en el grupo de interés en este estudio. A su vez, los resultados de TSI (Triple sugar iron) muestran que los bacilos no presentan un metabolismo fermentador para ningún hidrato de carbono, la prueba de indol que evalúa la capacidad del microorganismo de producir enzimas intracelulares como triptofanasa fue negativa y la prueba de catalasa positiva apoyan a la posibilidad de que otro género bacteriano sea el causante de la pudrición húmeda de estípite de la palma de aceite. Existen reportes que destacan el género *Pseudomonas* como altamente patógeno y con múltiples hospederos (Frijol, crisantemo, papa, pera, perejil, tabaco, cereza y tomate) (J. Paula et al., 1973).

Autores reportan *Pseudomonas* fluorescentes como agentes causales de podredumbre blanda en un gran número de plantas y que son un factor importante en la pérdida de cultivos antes y después de la cosecha (Janse, 1992), lo cual demuestra que la pudrición húmeda de estípite debe ser vista como una enfermedad que causaría grandes pérdidas en el sector palmicultor.

La cepa CPBZC-08 mostró fluorescencia en agar king B y según las pruebas bioquímicas es un bacilo gram negativo oxidador, generó daños foliares en una plántula en las pruebas de campo.

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

Medios diferenciales como Agar KB, Agar YDC no permiten la selección de un microorganismo en particular. Por tal motivo, se recomienda el empleo de medios selectivos como el cristal violeta-pectato modificado (CVP) con  $\text{NaNO}_3$ , este ayudará a distinguir colonias de *Erwinia* spp. de colonias de *Pseudomonas* spp. por el tipo de depresiones formadas en el medio pectato y la morfología de las colonias (Diane y Arthur, 1973).

### 10. CONCLUSIONES

Se logró la primera selección de seis cepas con características patogénicas asociados a la Pudrición húmeda del estípite en palma de aceite en pruebas *in vitro*, permitiendo avanzar en la determinación del agente biótico involucrado en la causa del problema y generando nuevas bases que direccionar y continuar con la investigación.

### 11. RECOMENDACIONES

- Se deben realizar nuevas pruebas de patogenicidad *in situ*, usando diferentes concentraciones de inóculo y dando condiciones adecuadas para el desarrollo de la infección.
- Se hace necesario realizar un mayor número de pruebas bioquímicas y la utilización y técnicas moleculares que permitan realizar la identificación de las colonias con capacidad patogénica.
- Considerando que aún no se ha logrado identificar el agente causal de la enfermedad, es necesario ampliar el número de muestreos para obtener un mayor número de microorganismos a evaluar.

### 12. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G .N. 2005. Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 p.

Borrero, C. 2006. Cultivo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Disponible en: [www.infoagro.com/herbaceos/oleaginosas/palma\\_aceite2.htm](http://www.infoagro.com/herbaceos/oleaginosas/palma_aceite2.htm). [Consultado: 5 de mayo de 2019].

Cupples, D & Kelman, A. Evaluation of Selective Media for Isolation of Soft-Rot Bacteria from Soil and Plant. Department of plant pathology, university of Wisconsin, madison. 468 p.

Fedepalma, & Minambiente. 2002. Guía ambiental para el subsector de la Agroindustria de la Palma de Aceite. Disponible en: <https://redjusticiaambientalcolombia.files.wordpress.com/2012/09/guc3ada-ambiental-para-el-subsector-palma-de-aceite.pdf>. [Consultado: 02-junio de 2019].

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

Fedepalma. 2007. Enfermedades en palma de aceite: un reto a la sostenibilidad de la agroindustria. Palmas Colombia (28): 5-6.

Fedepalma. 2010. Manual técnico de Palma Africana. Technoserve. 39p.

Fernández, H. 2009. Universidad Nacional de Agricultura, DAPV- Cultivos industriales. Disponible en: <https://www.google.com.co/search.manua-cultivo-de-palma>. [Consultado: 05 de mayo de 2019].

Garces, E., Coba, B., Castillo, N. 1996. Identificación de bacterias fitopatógenas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias, departamento de Biología Santafé de Bogotá. 56p.

Gurmit, S. 1995. Pudrición Basal de estípites de palma de aceite en Malasia. Palmas Colombia 16 (No Especial):219-225.

Henz, G. P. Becker, F.J. and Duarte, V. 2006. *Erwinia chrysanthemi*: pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasilia. 41 (10): 1567- 1571.

Janse, J. D., Derks, H. J., Spit, B. E. Van Der Tuin, W. R. Classification of Fluorescent Soft Rot *Pseudomonas* Bacteria, Including *P. marginalis* Strains, Using Whole Cell Fatty Acid Analysis. Department of Bacteriology, Plant Protection Service, 6700 HC Wageningen, the Netherlands. 538 p.

J. Paula Wilkie, D. W. Dye & D. R. W. Watson (1973) Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16(3): 315-323.

Mesa D., Jens. 2018. Fedepalma, 55 años de gestión gremial para desarrollar y consolidar la agroindustria de la palma de aceite en Colombia. *El Palmicultor*, edición febrero 2018 (552):5-7.

Mesa D., Jens. 2019. La producción de palma de aceite dejó, 3,7 billones de pesos el año pasado. *Revista Semana*. Disponible en: <https://www.semana.com/contenidos-editoriales/hay-campo-para-la-paz/articulo/la-produccion-de-palma-de-aceite-dejo-37-billones-de-pesos-el-ano-pasado/565796>. [Consultado: 24 de septiembre de 2019].

Mestizo, Y., Bandera, G., Aya, H., Sarria, G., Varón, F., Navia, M., y Martínez, G. 2012. Caracterización de síntomas e identificación de microorganismos en palmas de aceite afectadas por la Pudrición basal del estípites. *Palmas, Colombia* 33 (1):9-21.

Mujica G., Torres, E., Vargas, E. 2010. Evolución del sector palmicultor, Universitaria de investigación y desarrollo UDI. Bucaramanga. Disponible en: <http://www.udi.edu.co/images/investigaciones/publicaciones/libros/porter/08/Libro-EvoluciondelSectorPalmicultor.pdf>. [Consultado: 23 de Julio de 2019].

## Facultad de Ciencias Agropecuarias

Nieto, L. 1995. Incidencia de pudriciones de la palama de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Colombia. Palmas Colombia 16 (N° especial): 227-254.

Nieto, L. 1994. Pudrición basal del tallo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) causada por *Ganoderma* sp. Palmas Colombia 15(2):31-38.

Peña S., Rafael y Páez M., Jaime. Bacterias Fitopatógenas, el sitio web de la Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. Disponible en: <https://virtual.upte.edu.co/ova/fito/archivo/BACTERIAS.pdf> [Consultado 14 de septiembre de 2019].

Pineda L., Benjamín, Martínez L., G. Reconocimiento de enfermedades de la palma de aceite. Tecnologías para la agroindustria de la palma de aceite: Guía para facilitadores. Bogotá Colombia. 138p.

Rodríguez, P. A. 2001. Estudios Fitopatológicos sobre pudriciones de estípites en palma Africana de aceite. Hongos Basidiomicetos. Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 84p.

SISPA, 2019. Sistema de información del sector palmero. El sitio web de la Federación Nacional de cultivadores de palma. Disponible en: <http://web.fedepalma.org/sispa>. [Consultado: Mayo 5 de 2019].

Tovar, J., Nieto, L. 1998. Caracterización de las principales pudriciones de estipe de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), en la Zona Norte de Colombia. Palmas Colombia 19(2):45-52.

Turner, P.D. 1965. The incidence of *Ganoderma* disease of oil palms in Malaya and its relation to previous crop. *Ann. Appl. Biol.* 55: 417 - 423.

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

Vargas, F. M. 2016. Identificación y descripción de los posibles usos y mercados para la comercialización del aceite de palma alto oleico producido en Colombia. Universidad de la Salle, Facultad de ciencias agropecuarias. Bogotá D.C. Colombia. 70p.

Universidad de Cundinamarca  
Sede Fusagasugá

---



**Facultad de Ciencias Agropecuarias**