

**PRUEBAS DE PATOGENICIDAD *in vitro* CON MICROORGANISMOS
AISLADOS DE PALMAS AFECTADAS POR MARCHITEZ LETAL**

AUTOR

SILVIA MARITZA DUARTE SANMIGUEL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y VETERINARIA
BOGOTA D.C. 30 DE NOVIEMBRE DE 2007**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**PRUEBAS DE PATOGENICIDAD *in vitro* CON MICROORGANISMOS
AISLADOS DE PALMAS AFECTADAS POR MARCHITEZ LETAL**

SILVIA MARITZA DUARTE SANMIGUEL

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar el título de

MICROBIÓLOGA AGRÍCOLA Y VETERINARIA

Juan Pablo Tovar Molano, Director

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE Microbiología Agrícola y Veterinaria

Bogotá D.C.

30 de noviembre de 2007

**PRUEBAS DE PATOGENICIDAD *in vitro* CON MICROORGANISMOS
AISLADOS DE PALMAS AFECTADAS POR MARCHITEZ LETAL**

SILVIA MARITZA DUARTE SANMIGUEL

APROBADO



Juan Pablo Tovar Molano
Director

Ing. Agrónomo Mcs. Fitopatología

Clemencia Forero de la Rotta
Co Director

Ing. Agrónomo Mcs. Fitopatologí

Sandra Gómez

Jurado

Ing. Agrónomo Mcs. Fitopatología

Luís David Gómez

Jurado

Microbiólogo

**PRUEBAS DE PATOGENICIDAD *in vitro* CON MICROORGANISMOS
AISLADOS DE PALMAS AFECTADAS POR MARCHITEZ LETAL**

SILVIA MARITZA DUARTE SANMIGUEL

APROBADO

ANGELA UMAÑA MUÑOZ
M. Phil. Bióloga
Decano Académico

JANETH ARIAS PALACIOS
Bacterióloga M. Sc., M. Ed
Directora Carreras Microbiología

DEDICATORIA

A mis padres,
quienes siempre han buscado
mi felicidad por encima de la de ellos
y que con esfuerzo
me brindaron la oportunidad
de realizarme como profesional.

Por su apoyo, comprensión y
gran amor que me han
transmitido hoy y siempre.

A mi hermano por ser mi
amigo y estar conmigo
en los buenos y malos momentos.

A mis amigos
por ser tan leales, colaboradores y
hacerme sonreír cuando lo he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Clemencia Forero de la Rotta, por brindarme la gran oportunidad de desarrollar mi trabajo de grado en una gran empresa como lo es CENIPALMA, por su incondicional apoyo en los momentos mas difíciles.

A todo el equipo de CENIPALMA, en especial al Fitopatólogo Juan Pablo Tovar y a Fanny Rocío Fuentes, analista de laboratorio, por su orientación, apoyo constante y por los consejos tan acertados durante el desarrollo de esta investigación.

A la Plantación Palmas del Casanare por permitirme llevar a cabo parte de mi trabajo de investigación en sus instalaciones contando siempre con la colaboración de cada uno de sus trabajadores. En especial, gracias por las recomendaciones, apoyo y sugerencias que me brindó la Ing. Juliana Betancourt, Ing. Marta Lya Hernández y el Dr. Diego Gutiérrez.

A las grandes amistades que construí durante este lapso de mi vida en la zona oriental, especialmente a la Ing. Fanny Varón de Palmas del Casanare, por brindarme su amistad incondicional y colaboración.

A todos y cada uno de los integrantes del grupo Upía, por dejarme ser parte de su equipo de trabajo y brindarme la oportunidad de aportar mis conocimientos para lograr mis objetivos.

Noviembre de 2007

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	15
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1 Estudios sintomatológico	19
2.1.1 Síntomas externo	19
2.1.1.1 Marchitez Letal rápida	20
2.1.1.2 Marchitez Letal Lenta	20
2.1.2 Síntomas Internos	21
2.2 Posibles agentes causales de la enfermedad	22
2.2.1 Estudios Microbiológicos	22
2.2.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	22
2.2.1.2 <i>Ceratocystis paradoxa</i>	22
2.2.1.3 Bacterias	23
2.2.1.3.1 <i>Xylella fastidiosa</i>	23
2.2.1.4 Estudios con microorganismos flagelados (<i>Phytomonas</i> sp)	24
2.2.1.5 Estudios con fitoplasmas	24
2.2.2 Estudios Epidemiológicos	24
2.3 Perdidas económicas	25
2.4 Practicas de manejo	26
2.4.1 Manejo preventivo	26
2.4.2 Control	27
2.4.3 Diagnóstico temprano	27
2.4.4 Erradicación de palmas con Marchitez Letal	28
2.4.4.1 Erradicación con palin	29
2.5.4.2 Erradicación con motosierra	29
2.5.4.3 Erradicación con herbicidas	30
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	31
3.1 Formulación del problema	32
3.2 Justificación	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo General	34
4.2 Objetivos específicos	34

5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Diseño de la Investigación	35
5.1.1 Tejidos	35
5.1.2 Plántulas	35
5.2 Localización	36
5.2.1 Obtención de microorganismos asociados a palmas afectadas por Marchitez Letal	37
5.2.2 Metodología para separar organismos saprofitos de posibles fitopatógenos asociados a la Marchitez Letal	37
5.2.2.1 Toma de muestra	40
5.2.2.2 Procesamiento de las muestras	41
5.2.3 Selección y purificación de microorganismos	42
5.2.3.1 Bacterias	42
5.2.3.2 Hongos	42
5.2.3 Almacenamiento de microorganismos	43
5.2.3.1 Almacenamiento de bacterias	43
5.2.3.2 Almacenamiento de Hongos	43
5.3 Determinación de la Patogenicidad <i>in vitro</i> de microorganismos seleccionados como posibles patógenos	44
5.3.1 Selección de microorganismos para pruebas de patogenicidad <i>in Vitro</i>	44
5.3.1.1 Bacterias	44
5.3.1.2 Hongos	45
5.3.2 Prueba de patogenicidad	47
5.3.2.1 Tejidos	47
5.3.2.1.1 Inoculación en trozos de raíces y raquis	50
5.3.2.2 Plántulas de un mes	52
5.3.2.1.2 Inoculación en plántulas	53
5.4 Análisis estadístico	54
5.4.1 Tejidos	55
5.4.2 Plántulas	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1 Muestreo, caracterización morfológica macroscópica y microscópica de colonias bacterianas y hongos	57

6.1.1 Bacterias	57
6.1.2 Hongos	62
6.2.2 Pruebas de patogenicidad	66
6.2.2.1 Periodo de incubación bacterias	66
6.2.2.2 Periodo de incubación hongos	68
6.2.3 Porcentaje daño de tejido o necrosis	70
6.2.3.1 Bacterias	70
6.2.3.2 Hongos	72
6.2.4 Porcentaje daño o necrosis de tejido en raquis	75
6.2.4.1 Bacterias	75
6.2.4.2 Hongos	78
7. CONCLUSIONES	83
8. RECOMENDACIONES	84
9. BIBLIOGRAFIA	85
10.ANEXOS	88

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica plantaciones del bajo Upía.	18
Figura 2. Incidencia ML, septiembre de 2007	19
Figura 3. Ubicación de las palmas enfermas en varios momentos en el tiempo.	24
Figura 4. Erradicación con palín	29
Figura 5. Erradicación con motosierra.	29
Figura 6. Erradicación con herbicida.	30
Figura 7. Síntomas iniciales de palmas jóvenes afectadas por ML	38
Figura 8. Tejidos afectados por marchitez letal, muestras a procesar.	39
Figura 9. Palmas sanas y tejidos sanos.	40
Figura 10. Cámaras húmedas con tejidos afectados por ML.	41
Figura 11. Colonias bacterianas sembradas en medio NA.	42
Figura 12. Comparación macroscópica de colonias bacterianas a las 24 h después de siembra en medio NA.	42
Figura 13. Toma de tejidos de palma sana adulta para pruebas <i>in vitro</i>	47
Figura 14. Procesamiento de tejidos de palma sana adulta para pruebas <i>in vitro</i>	49
Figura 15. Procesamientos tejidos a inocular.	50
Figura 16. Semillas y plántulas montadas en recipientes de vidrio.	52
Figura 17. Plántulas montadas en recipientes de vidrio.	53
Figura 18. Total bacterias agrupadas por estado de la muestra y resultados coloración de Gram.	57
Figura 19. Total bacterias aisladas a partir de tejidos sanos agrupados por tejido y prueba de Gram.	58
Figura 20. Total bacterias aisladas a partir de tejidos enfermos agrupados por tejido y resultados prueba de Gram.	59
Figura 21. Proceso de selección y resultados de colonias bacterianas para pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	60
Figura 22. Aislamiento de <i>Fusarium</i> sp, de tejidos enfermos.	63
Figura 23. Hongos aislados en medio de cultivo provenientes de palmas con síntomas de Marchitez letal.	64
Figura 24. Aislamiento de <i>Cephalosporium</i> sp a partir de tejido parte baja del bulbo enfermo.	66
Figura 25. Aislamiento de <i>Thielaviopsis</i> sp aislado de tejido enfermo.	66

Figura 26. Curva de Análisis de sobrevivencia de tejidos de raquis y raíz inoculados con bacterias.....	67
Figura 27. Curva de Análisis de sobrevivencia de tejidos de raquis y raíz inoculados con hongos.....	69
Figura 28. Porcentaje de daño de raíz inoculada con bacterias aisladas de tejidos afectados por Marchitez Letal.....	71
Figura 29. Observación de estructuras hifales sobre tejido de raíz inoculado....	72
Figura 30. Porcentaje de daño de tejido de raíz, inoculado con hongos aislados de palmas afectadas por Marchitez Letal.....	73
Figura 31. Raíces inoculadas.....	74
Figura 32. Trozos de raquis inoculados con bacterias aisladas de palmas afectadas por ML.....	76
Figura 33. Porcentaje daño o necrosis de tejidos inoculado con bacterias.....	77
Figura 34. Porcentaje de daño en raquis causado por hongos aislados de palmas con ML.....	78
Figura 35. Trozos de raquis inoculados con <i>Thielaviosis sp</i> , afectadas por ML.	79
Figura 36. Evaluación de plántulas inoculadas con hongos y bacterias aislados de tejidos afectados por Marchitez Letal.....	81

TABLA DE ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 ANEXO I. Toma de muestras.....	88
10.2 ANEXO II. Datos palmas muestreadas	89
10.6 ANEXO III. Ensayos en tejidos, hongos o bacterias.....	90
10.7 ANEXO IV. Ensayos en plántulas, hongos o bacterias.....	91
10.8 ANEXO V. Periodo de incubación en raquiz y raíz análisis de sobrevivencia en bacterias.....	92
10.9 ANEXO VI. Periodo de incubación en raquis y raíz análisis de sobrevivencia hongos.....	93
10.10 ANEXO VII. Porcentaje daño o necrosis de tejido raíz bacterias.....	94
10.11 ANEXO VIII. Porcentaje daño o necrosis de tejido raíz hongos... ..	95
10.12 ANEXO IX. Porcentaje daño o necrosis de tejido raquis bacterias.....	96
10.13 ANEXO X. Porcentaje daño o necrosis de tejidos raquis hongos.....	97

RESUMEN

En la actualidad y desde hace siete años atrás, se ha venido presentando una enfermedad en algunas plantaciones de la zona oriental de Colombia, denominada Marchitez Letal. Por el tiempo de infección y diseminación de esta enfermedad, se cree que ataca rápidamente a la palma provocando su muerte en un lapso de 3 a 4 meses. Se han realizado gran número de investigaciones buscando el agente causal de este disturbio, como aislamientos de microorganismos bacterianos y fungos a partir de tejidos afectados por Marchitez Letal y sus respectivas pruebas de patogenicidad obteniendo resultados inconsistentes. Las muestras procesadas para obtener los microorganismos fueron tomadas a partir de palma adulta, debido a que inicialmente este disturbio solo se presentaba en este tipo de palmas. En el año 2006 se presentó la enfermedad en palmas jóvenes permitiendo agilizar y facilitar la toma de muestra de tejidos afectados en época temprana.

Con base en estos antecedentes, en este ensayo se realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro* con microorganismos posiblemente patógenos asociados con palma de aceite afectadas por Marchitez Letal. Se realizaron aislamientos de 15 palmas jóvenes que presentaban síntomas de la enfermedad, las cuales fueron erradicadas para extraer tejidos afectados como raíces, pedúnculo de racimos, parte baja del bulbo (conecta con las raíces), parte media del bulbo y zona lateral del bulbo que conecta con las hojas. A partir de estos tejidos se aislaron 18 hongos y 28 colonias bacterianas diferentes usando medios de cultivo comunes y semiselectivos. Estos microorganismos se seleccionaron por medio de un proceso de comparación con microorganismos aislados de tejidos tomados de cinco palmas jóvenes sanas, eligiendo únicamente los aislamientos que se encontraban en tejidos de palmas enfermas.

La patogenicidad de los microorganismos seleccionados fue determinada mediante la inoculación de tejidos de palma adulta y plántulas de palma de un mes bajo condiciones *in vitro*. En el ensayo de plántulas y tejidos no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con las 28 colonias bacterianas y los 18 hongos, debido a que el material inoculado no presentó expresión de daño ni necrosis de tejidos internos ni externos.

Sugiriendo que los microorganismos inoculados no tienen relación con la enfermedad.

Palabras clave: Marchitez Letal, pruebas de patogenicidad *in vitro*, microorganismos.

SUMMARY

At present and since seven years ago, it has been presenting a disease in some plantations in the east, called Lethal Witherness. For the period of infection and spread of this disease, it is believed that attacks quickly to palm causing his death in a period of 3 to 4 months. Numerous investigations have been conducted looking for the causative agent of this disturbance, such as bacterial isolates of microorganisms and others from tissues affected with the disease and their pathogenicity tests. All these microbiological processes mentioned above were carried out with adult palms because of this disturbance only initially was presented in this type of palms. In the year 2006 the disease was presented in young palms allowing to expedite and to facilitate the sampling of tissues involved in early times.

Based on this background, with this essay, tests of pathogenicity were done *in vitro* with potentially pathogenic microorganisms associated with oil palm affected by Lethal Witherness, doing isolations of 15 young palms which showed symptoms of the disease, which were eradicated in order to extract tissue as roots, stalk clusters, bottom of the bulb (connects to the roots), middle of the bulb and lateral bulb area that connects with the leaves. From these tissues were isolated 18 fungi and 28 bacterial colonies using common resources and semiselectivos. These microorganisms were selected through a process of comparison with microorganisms isolated from tissue taken from five healthy young palms, choosing only the isolating in palm diseased tissues.

The pathogenicity of selected microorganisms was determined by injecting adult tissues palm and palm seedlings for a month under *in vitro* conditions. In the trial of seedlings and tissue there were no significant differences between the treatments, showing that the material inoculated did not present expression of tissue necrosis or damage internally or externally. It suggests that the microorganisms inoculated are unrelated with the disease.

Keywords: Lethal Witherness, pathogenicity tests in vitro, microorganisms.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la demanda de aceites de palma y biocombustibles ha venido en continuo y creciente aumento en los últimos años, razón por la cual la extensión del cultivo de ésta en el territorio Colombiano se ha incrementado en los últimos 15 años hasta tener 300.250 hectáreas establecidas al final del 2006, (Fedepalma, 2007) con tendencia creciente de nuevas plantaciones debido a la potencial demanda del biodiesel. En declaraciones dadas por el Dr. Jorge Bendeck, Presidente Ejecutivo de la Federación Colombiana de Biocombustibles en el programa La Hora de la Verdad del 28 de noviembre de 2007, el potencial de empleabilidad que brindarán los cultivos de palma de aceite, en los siguientes doce años es de 180.000 empleos directos y 60.000 empleos indirectos para beneficio de alrededor de 3.000.000 de colombianos con una inversión de cerca de 10.000 millones de dólares generando con esto una verdadera “Revolución Social” en nuestro país.

Entre los retos mas grandes que enfrenta el cultivo de palma de aceite está la necesidad de un crecimiento continuo de rendimiento por unidad de área, pretendiendo satisfacer la demanda alimenticia de la creciente población mundial. El desarrollo sostenible de los cultivos de palma de aceite requiere de la puesta en marcha de las mejores técnicas de agricultura y manejo agrícola, las cuales deben ser acordes con la naturaleza ofreciendo las herramientas para satisfacer las necesidades alimenticias de la sociedad y asegurar un medio ambiente limpio y sostenible.

Todo lo anterior determina el interés por parte de la agricultura colombiana por la expansión del área sembrada, la cual podría superar los cinco millones de hectáreas, sin requerir deforestación alguna, como declara el Dr. Bendeck.

Sin embargo, la expansión del cultivo de la palma ha generado la aparición de problemas fitosanitarios casi siempre asociados o influenciados por el deficiente manejo de la relación suelo-agua-planta y ambiente.

Desde el inicio del cultivo de la palma de aceite en Colombia, se ha tenido que sortear una serie de problemas fitosanitarios que pueden ser de origen biótico y/o abiótico y constituyen verdaderos retos para investigadores y técnicos ya que afectan indirectamente la productividad del cultivo.

Entre los problemas bióticos que se han presentado en el cultivo de palma se reportan los causados por insectos, hongos, bacterias, virus y fitoplasmas. Algunos de ellos al no ser manejados correctamente, pueden llegar a ser letales para la palma (Revista palmas, 2003).

Uno de los problemas más serios que se han presentado en el sector palmicultor es el que actualmente se denomina Marchitez Letal (ML). Este disturbio se viene presentando explícitamente en la zona oriental de Colombia, inicialmente en el sur del departamento de Casanare en el año de 1994 y posteriormente a partir del año 2002 en plantaciones vecinas ubicadas en el norte del departamento del Meta. De acuerdo con la información suministrada por las plantaciones de esta zona, a septiembre de 2007 la zona del bajo Upía cuenta con un área de siembra aproximada de 15.200 has, de las cuales se han erradicado alrededor de 51.678 palmas afectadas por este disturbio que llegan a ser equivalentes a 325.75 has erradicadas en las cinco plantaciones afectadas (Grupo Upía, 2007).

Por la similitud de algunos síntomas con los de otras enfermedades que afectan el cultivo de palma, en estudios previos se realizaron pruebas para determinar si se trataba de alguna variación de Marchitez Sorpresiva y Anillo Rojo, enfermedades causadas por factores bióticos y que han significado grandes pérdidas económicas para el sector palmero. Los resultados siempre fueron negativos y sugirieron que se trataba de un problema diferente de naturaleza biótica y agente causal desconocido (Torres *et. al* 2006).

Cenipalma, como Centro de Investigación del sector palmicultor Colombiano, y las plantaciones afectadas ante esta situación, crearon un grupo de investigación el cual adelanta trabajos basados en unificación de criterios diagnósticos, identificación del agente causal, fisiología, epidemiología, insectos vectores y búsqueda de materiales tolerantes como primer paso para el conocimiento básico de la enfermedad.

Con base en esto con este trabajo se pretendió identificar y aislar microorganismos posiblemente patógenos siguiendo los postulados de Koch. El presente trabajo se basó en la identificación de posibles agentes causales, realizando pruebas de patogenicidad *in vitro* con microorganismos que se obtuvieron del procesamiento de palmas jóvenes enfermas con Marchitez Letal.

Las pruebas de patogenicidad *in vitro* son una herramienta efectiva ya que arrojan resultados rápidos y en el caso de cultivos perennes como lo es el cultivo de la palma de aceite, llega a ser un procedimiento efectivo. (Grupo Upía, 2007).

2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

Desde el año de 1994 en Palmar de Oriente, 1999 en Palmas del Casanare y Palmeras Santana y por último desde el 2002 en Palmar del Upía y Agropecuarias Guadualito, plantaciones ubicadas en la zona oriental de Colombia, se viene presentando un disturbio de carácter letal (denominado “Marchitez Letal”) el cual por su agresividad se constituye en una grave amenaza para la palmicultura de la región (Grupo Upia, 2007) (Figura 1).

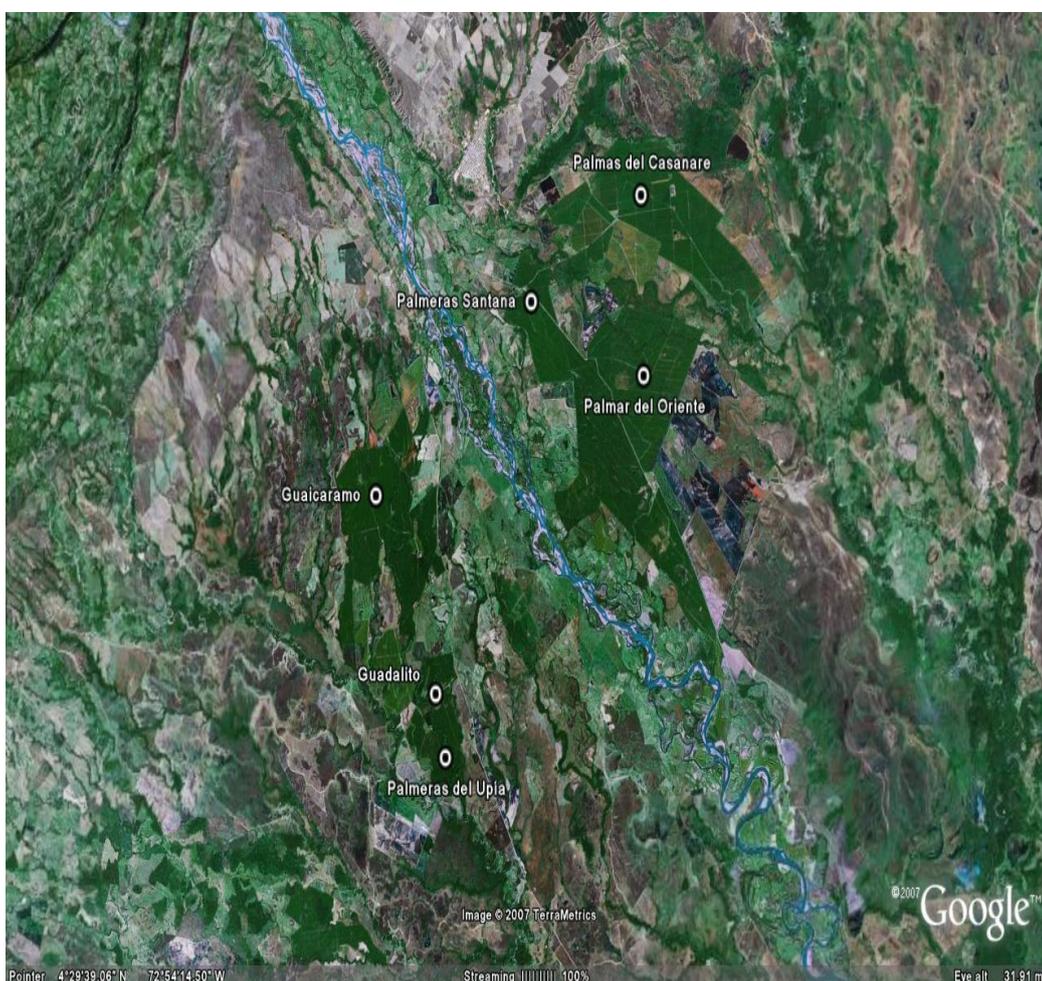


Figura 1. Ubicación geográfica plantaciones del bajo Upía. (Tomado de información personal Dr. Diego Gutierrez).

A partir de junio del año 2001 se reportó a Cenipalma este disturbio que hasta el día de hoy ha ocasionado la muerte de por lo menos 51.678 palmas, las cuales equivalen a 325.75 has erradicadas (Grupo Upia, 2007) no solo en las

plantaciones antes mencionadas sino en plantaciones vecinas ubicadas tanto en el norte del departamento del Meta como en el sur del Casanare (figura 2).

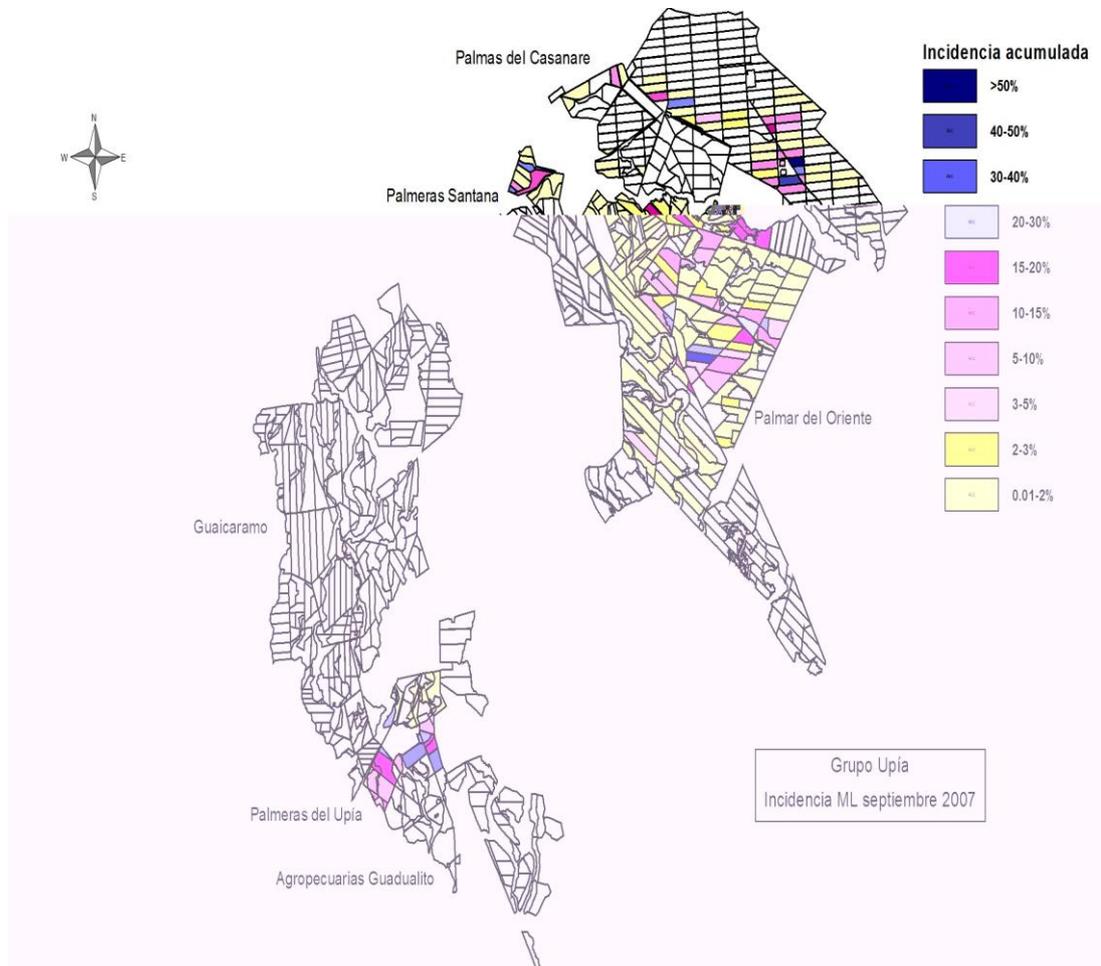


Figura 2. Incidencia ML, septiembre de 2007.

2.1 Estudios Sintomatológicos

La Marchitez Letal presenta diferentes síntomas según la edad de la palma. Sin embargo, siempre presenta algunos síntomas característicos tanto en la parte externa como en la parte interna de la palma, los cuales son usados para el diagnóstico de la enfermedad en campo (Fajardo *et. al*, 2005).

Entre los síntomas externos característicos utilizados para el diagnóstico de palmas afectadas por marchitez letal se encuentran:

- Secamiento de las hojas de la palma, empezando por la punta y borde de los foliolos.
- Pudrición de racimos, en los cuales se observa inicialmente la pérdida de brillo seguida por desprendimiento y secamiento de los frutos. En inflorescencias, se presenta pudrición húmeda y seca con coloración marrón clara y olor a fermento.
- Pudrición de raíces: Las raíces toman coloraciones marrón oscura y la pudrición puede ser seca o húmeda.

En palmas adultas de más de siete años, la enfermedad presenta dos tipos de manifestación de sintomatología externa (Marchitez Letal rápida y Marchitez Letal lenta) que se determina por la velocidad del deterioro de la palma.

2.1.1.1 Marchitez Letal rápida

Desde la aparición de los primeros síntomas hasta la muerte de la palma, transcurren entre 2 y 5 semanas. No se presenta amarillamiento, sin embargo hay un secamiento generalizado del follaje. Este se caracteriza por ser de aparición súbita y de rápido progreso.

El secamiento es tan rápido que en su inicio puede no presentarse amarillamiento en las palmas, no se observa pudrición en racimos y base de las flechas, por lo tanto estas permanecen erectas. En cuanto al follaje este no se fracturan, queda seco y erecto. Los bordes de los foliolo se entorchan hacia adentro. En general el mejor criterio de diagnóstico para la Marchitez rápida en cuanto a síntomas se refiere, es el secamiento generalizado de las puntas, bordes de los foliolos y puede o no estar acompañado de pudrición de racimos (Fichas Técnicas, Marchitez Letal 2007).

2.1.1.2 Marchitez Letal Lenta

Desde la aparición de los primeros síntomas hasta la muerte de la palma transcurren entre 4 a 7 meses, se observa secamiento de los foliolos en los niveles medios y superiores. A medida que se presenta el secamiento del follaje, este va precedido de amarillamiento de los foliolos. Siempre se presenta

podrición de racimos y suele aparecer podrición de flechas en estados intermedios y avanzados. En etapa avanzada se observa la fractura de hojas que se han secado previamente. Si la palma permanece en pie se puede ver emisión de flechas dando la apariencia de una posible recuperación pero la palma con el paso del tiempo irremediabilmente muere (Fichas Técnicas, Marchitez Letal 2007).

2.1.2 Síntomas Internos

Como síntomas internos se observa deshidratación de tejidos. Durante los estados intermedios y avanzados de la enfermedad en palma adulta, la parte alta del estípote presenta un halo amarillento hacia la periferia. La sintomatología en palma joven difiere al presentar una leve decoloración en la parte interna del bulbo. En estados avanzados puede haber podrición fétida y acuosa de flechas, con aspecto gelatinoso.

Una de las características principales de los síntomas internos es que los racimos inicialmente pierden brillo y posteriormente se secan, además los frutos se desprenden fácilmente de los racimos y presentan podrición en la base. De la misma forma, las inflorescencias presentan podrición lo cual se ve reflejado en la disminución de nuevos frutos (Fichas Técnicas, Marchitez Letal 2007).

2.2 Posibles agentes causales de la enfermedad

Existen varios microorganismos fitopatógenos capaces de inducir marchitamientos en plantas y que se ajustan a los patrones epidemiológicos descritos por el Dr. Torres en el 2004, el cual investigó el comportamiento epidemiológico de la enfermedad. Entre los microorganismos se encuentran bacterias como *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* y bacterias del grupo *Corynebacterium* y hongos de los géneros *Ceratocystis*, *Fusarium oxysporum* y *Verticillium* sp (Agrios, 2005). Además de agentes infecciosos como virus, bacterias fastidiosas y fitoplasmas. En el caso de la ML se ha generado varias hipótesis acerca de su etiología, según se presenta a continuación.

2.2.1 Estudios Microbiológicos

2.2.1.1 *Fusarium oxysporum*

Por algunas similitudes en algunos de los síntomas que presenta la palma afectada por Marchitez Letal con los de la Fusariosis o Marchitez Vascular que es ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*, la enfermedad fue inicialmente denominada Marchitez Vascular (Calvache *et al*, 2005) para corroborar esta hipótesis por medio de pruebas de patogenicidad, se evidenció que *Fusarium oxysporum*, no era el agente causal de la Marchitez Letal (Sánchez *et al*, 2003).

Estas observaciones fueron el soporte experimental de los conceptos dados por especialistas extranjeros conocedores del problema en África (Airede, C. 2002., Franqueville, H. 2002).

2.2.1.2 *Ceratocystis paradoxa*

Esta hipótesis sugiere que la pudrición de frutos, fractura y amarillamiento de hojas, puede ser causada por este hongo (Airede, C. 2002). Los análisis microbiológicos llevados a cabo por Cenipalma no muestran resultados concluyentes acerca de la participación de este patógeno como agente causal.

2.2.1.3 Bacterias

Estudios realizados por el dr. Carlos Lozano (2002) sugirió la participación de bacterias como agente causal de la enfermedad y la denominó PBR (pudrición bacteriana de la raíz), por los síntomas de necrosis y destrucción progresiva del sistema radical; como resultado de sus trabajos de investigación postuló las bacterias *Pantoea agglomerans* y *Pseudomonas stutzeri* como responsables de la enfermedad (Gutierrez, Información personal).

No obstante pruebas de patogenicidad realizadas con estas bacterias, en la plantación Palmas del Casanare fueron negativas descartando la hipótesis del dr. Lozano. Con base en estos resultados Cenipalma desarrolló pruebas de patogenicidad con 39 bacterias aisladas de palmas enfermas, obteniendo nuevamente resultados negativos (Gutiérrez, 2003).

2.2.1.3.1 *Xylella fastidiosa*

Se consideró posible la presencia de esta bacteria, pues causa enfermedades tipo Marchitez como la enfermedad de Pierce de la uva, Clorosis variegada de los cítricos y Raquitismo de la soca de la Caña de azúcar (Agrios, 2005). Por lo tanto se realizó un trabajo para detectar molecularmente la bacteria mediante PCR con los cebadores universales y específicos. Los resultados permitieron concluir que *X. fastidiosa* no estaba presente en los tejidos afectados (Sierra et al., 2006).

2.2.1.4 Estudios con microorganismos flagelados (*Phytomonas* sp)

Por la similitud de los síntomas entre la Marchitez Sorpresiva y la Marchitez Letal sugirió que se trataba de la misma enfermedad causada por *Phytomonas* sp. Se realizó una búsqueda sistemática de flagelados tanto en palmas con ML como en insectos hemípteros, los cuales han sido catalogados como posibles vectores de la enfermedad. Sin embargo, en ningún caso se encontraron flagelados, lo cual contrastó con los resultados obtenidos para dos palmas en la misma zona con síntomas típicos de Marchitez Sorpresiva en las cuales la detección de flagelados fue positiva (Torres *et al*, 2006).

2.2.1.5 Estudios con fitoplasmas

Esta hipótesis, presentada y sustentada por un grupo de investigadores del CIAT, sugiere que la enfermedad es causada por un fitoplasma (bacteria sin pared celular) el cual es transmitido por un insecto vector (CIAT, 2003). Cenipalma desarrolló estudios en pruebas de diagnóstico indirecto utilizando Oxitetraciclina, el cual es un antibiótico que inhibe la acción de estos microorganismos y detiene el desarrollo de la enfermedad. Resultados preliminares no han demostrado efecto positivo en la remisión de síntomas de palmas enfermas con este antibiótico (Tovar, 2006).

Los fitoplasmas se encuentran exclusivamente en los vasos floemáticos, normalmente tienen una distribución heterogénea en la planta y se presentan en bajas concentraciones. Estas características hacen difícil su detección e

identificación. La asociación de estos organismos con una enfermedad en particular puede estar basada en expresión de síntomas, visualización de estructuras pleomórficas con una membrana trilaminar en las células del tejido conductor del floema, y disminución de síntomas mediante aplicaciones de antibióticos (tetraciclinas). En la actualidad, métodos serológicos y moleculares permiten en forma simple, sensitiva y confiable la detección e identificación de estos organismos (Eden, Green, 2003). Actualmente, técnicas serológicas y moleculares han proporcionado herramientas para la detección de fitoplasmas, aún en bajas concentraciones, mejorando la seguridad en el diagnóstico. El desarrollo de técnicas tales como la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando iniciadores universales que se aparean en sectores conservados de la región del 16S rADN de procariotes, ha permitido la detección de diferentes fitoplasmas, aún en tejidos donde su concentración es baja (Smart, *et al.*, 1996).

2.2.2 Estudios epidemiológicos

El estudio epidemiológico realizado por el Dr. Enrique Torres en el año 2004 de la enfermedad indicó claramente la intervención de por lo menos un agente biótico. Los análisis temporales realizados con los datos de incidencia muestran patrones de crecimiento de la epidemia que se ajustan adecuadamente a las características del crecimiento de organismos patógenos en poblaciones (Figura 3). Tanto el progreso temporal como el patrón espacial sugieren que la enfermedad es incapaz de dispersarse a largas distancias en períodos cortos de tiempo y requiere de un estrecho contacto entre palmas sanas y enfermas para que se presente el contagio. Este tipo de comportamiento se ajusta a patógenos del suelo o cuyos agentes de diseminación tienen limitada capacidad de movimiento (Torres y Tovar, 2004); observando así que el agente causal de la Marchitez Letal es de origen biótico.

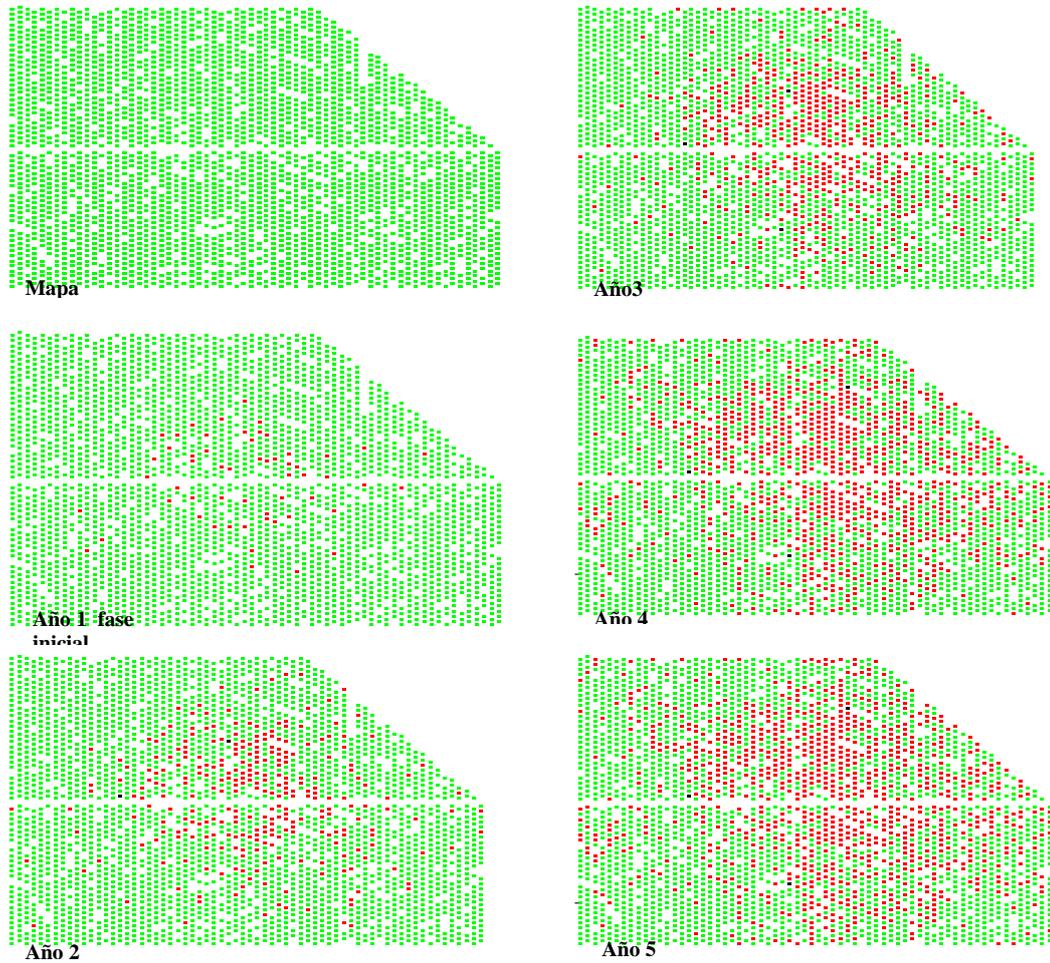


Figura 3. Ubicación de palma enfermas en varios momentos en el tiempo.

Se aprecia en la figura tres como las palmas enfermas delimitaron en el mapa un espacio dentro del cual se fueron acumulando de manera agregada los nuevos casos (puntos rojos).

2.3 Perdidas económicas

El monto total de pérdida económica que afecta a un productor como consecuencia del ataque de una enfermedad letal, es el resultado de la agregación de cuatro componentes: 1) La pérdida asociada al costo de establecimiento y el mantenimiento durante los primeros tres años (fase improductiva), 2) La disminución en el ingreso esperado por la disminución de la producción de fruto fresco, consecuencia de la erradicación de palma, 3) La pérdida en la producción de toneladas de RFF (racimos de fruto fresco) a la que se ha dado lugar en los lotes atacados por la enfermedad, mientras que la incidencia de la misma ha venido aumentando y 4) Los costos asociados a la erradicación de las palmas (CENIPALMA, M, Mosquera., 2006).

Según estudios epidemiológicos, el comportamiento de la enfermedad se presenta en forma de focos, de manera que con el tiempo, se da lugar a pérdida de áreas completas por el ataque de la enfermedad.

En total la pérdida asociada a la Marchitez Letal, para el período comprendido entre 1994 año en que se presentó la enfermedad, hasta el 2006 oscila alrededor de **13.050 millones de pesos**, considerando un área de 11.200 has que corresponde al área de las plantaciones afectadas por ML (CENIPALMA, M, Mosquera., 2006).

2.4 Prácticas de manejo

Cenipalma como centro de investigación ha desarrollado experimentos conducentes a disminuir la incidencia de la enfermedad por medio de prácticas culturales.

2.4.1 Manejo preventivo

El manejo preventivo se aplica cuando la enfermedad no se ha reportado y busca impedir o retrasar la aparición de ésta. Se deben manejar conceptos como buenas prácticas agronómicas, manejo de gramíneas con coberturas,

capacitación de operarios, revisiones periódicas (cada 2 o 3 meses o incluida dentro de las revisiones rutinarias para Anillo Rojo o PC, etc.).

- Las prácticas de manejo para prevenir el incremento de la incidencia y la formación de focos de la enfermedad consisten en:
 - Inspecciones de campo periódicas para detectar en forma oportuna las palmas enfermas mediante diagnóstico de síntomas externos iniciales.
 - Erradicación oportuna de palmas enfermas.
 - Buenas prácticas agronómicas.
 - Reducir la presencia de gramíneas en los lotes mediante buen manejo de coberturas.

2.4.2 Control

El control se realiza una vez la enfermedad se presenta. Hay que destacar que la enfermedad en su etapa inicial delimita un espacio (focos) que se viene llenando con el tiempo, con una lenta expansión por fuera de los linderos iniciales. La recomendación está encaminada a la erradicación de estas palmas y al monitoreo de las palmas vecinas para evitar que el brote se renueve (plantas en observación).

2.4.3 Diagnóstico temprano

Se basa en revisiones e inspecciones frecuentes de cada 15 días, aplicando los criterios diagnósticos, mencionados anteriormente para la identificación de palma enfermas en campo.

Cabe destacar que no siempre las plantas afectadas cumplen los criterios de diagnósticos, por eso en algunas ocasiones se hace necesario dejar palmas en

observación para ser evaluadas un mes después y tomar la decisión de erradicar o no de acuerdo a los síntomas característicos de la Marchitez Letal.

2.4.4 Erradicación de palmas con Marchitez Letal

En el proceso evolutivo de la enfermedad, una palma enferma dentro de un lote puede constituirse en el inicio de un foco de ML. Igualmente, no se debe olvidar que hay insectos que podrían ser los posibles vectores de la enfermedad. Debido a este comportamiento se deben tomar medidas drásticas como la erradicación de las palmas afectadas por ML y con síntomas iniciales de la enfermedad.

2.4.4.1 Erradicación con palín

La erradicación consiste en cortar el sistema radical en contorno lo más cercano al bulbo de la palma hasta provocar su caída; se cortan todas las hojas y se amontonan junto al estípote (Figura 4). Este método ofrece una menor exposición de tejido a la acción de los insectos, debe complementarse con la aspersión periódica de un insecticida sugerido por un Agrónomo (Boletín informativo, 2007).



Figura 4, Erradicación con palín.

2.4.4.2 Erradicación con motosierra:

Consiste en hacer un corte con motosierra lo más próximo a su base con el fin de acelerar la descomposición del pequeño tronco remanente y reducir el riesgo de que se reproduzcan allí los insectos diseminadores (Figura 5). Al igual que en el caso anterior, las hojas y desechos de la erradicación se amontonan junto al estípite y se asperjan con el insecticida.



Figura 5. Erradicación con motosierra.

2.4.4.3 Erradicación con herbicidas:

Consiste en aplicar un herbicida sistémico mediante la inyección del producto al estípite (Figura 6). Para evitar la reproducción de los insectos vectores de ML se debe aplicar 20 ml de un insecticida sistémico por lo menos dos días antes de aplicar el herbicida.

Tanto en la aplicación del insecticida como del herbicida se debe tener cuidado que los orificios queden sobre tejido funcional para que la aplicación sea eficaz; ésto se puede verificar observando que el tejido que se saca al hacer el orificio esté sano o sea de color crema (Boletín informativo, 2007).



Figura 6. Erradicación con herbicida

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Formulación del problema

En Colombia la producción de Palma de aceite (*Elaeis guineensis*) es una de las principales actividades agrícolas y se ha convertido en una gran alternativa de generación de empleo no solo en las zonas donde se cultiva, sino también a nivel nacional ya que es considerada una gran estrategia para la economía de Colombia. La producción de palma de aceite en estos últimos años ha presentado un enorme crecimiento no sólo por que de ella se obtienen productos para consumo humano si no por la implementación del aceite de palma como combustible biológico con alta potencialidad exportadora (FEDEPALMA, 2007).

La siembra extensiva de cualquier tipo de cultivo trae consigo problemas edáficos y fitopatológicos entre otros. Desde el año de 1994 la producción de aceite de la zona del bajo y alto Upía, ha venido presentando una caída reflejándose en pérdidas para sus cultivadores. Este disturbio se debe a una enfermedad de carácter letal a la cual se le denominó por su sintomatología 'Marchitez Letal' (Acosta *et. al* 2001).

La Marchitez Letal de la Palma de Aceite (ML) es una enfermedad que apareció en la zona de los Llanos Orientales de Colombia y se ha venido propagando tan rápidamente que es considerada el principal riesgo fitosanitario para la palmicultura de la región. En esta zona se han sembrado alrededor de 15.200 has de palma, de las cuales se han erradicado por este disturbio 325,5 hectáreas con una incidencia del 3.25% de plantas afectadas por Marchitez Letal (Grupo Upía, 2007).

Esta enfermedad presenta características diferentes a todas aquellas registradas para el cultivo, una de ellas es su sintomatología, en la cual se observa amarillamiento de hojas, pudrición de racimos y necrosis de tejidos vasculares.

El agente causal de esta enfermedad aún no se conoce, esto hace que su control y manejo sean difíciles por no conocer cuales son las características de este patógeno.

Su comportamiento epidemiológico indica claramente la intervención de por lo menos un agente biótico y las recomendaciones de todos los asesores nacionales e internacionales que han analizado el problema, coinciden en afirmar que se deben realizar estudios etiológicos (Airede, C. 2002).

3.2 Justificación

El disturbio actualmente denominado ML continúa representando un problema sanitario de amplia repercusión económica en las plantaciones de la región del norte del Meta y sur del Casanare, en donde se ha manifestado hasta la fecha. A pesar de que la investigación adelantada no ha permitido identificar aún su agente causal, se han logrado avances importantes en el conocimiento de la enfermedad a través de los estudios epidemiológicos adelantados por Cenipalma.

Desde el punto de vista práctico, sin una identificación apropiada, no es posible desarrollar métodos de detección sensibles y precisos que permitan controlar subsecuentemente esta enfermedad. Solo la identificación del agente causal de la enfermedad permitirá desarrollar y validar estrategias de manejo que eviten su diseminación a otras regiones palmeras del país y disminuir las pérdidas económicas que ponen en riesgo la palmicultura de la región. (Tovar, Proyecto Ministerio de Agricultura).

La determinación de los agentes causales, es el primer paso para establecer estrategias adecuadas de manejo en el caso de las enfermedades de cultivos. Para conseguir este objetivo, existen diferentes herramientas las cuales van desde la simple observación de signos sobre los tejidos afectados hasta complejos procedimientos de biología molecular, pasando por aislamientos tradicionales en medios de cultivo generales o específicos.

Este proyecto hace parte de una serie de investigaciones que se están llevando a cabo en busca del agente causal de la Marchitez Letal en palma de aceite, el cual tiene como objetivo mediante aislamientos de hongos y bacterias obtenidos a partir de tejidos de palmas jóvenes con síntomas iniciales de ML, realizar

pruebas de patogenicidad *in vitro* para cumplir de manera parcial los postulados de Koch.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Realizar pruebas de patogenicidad *in vitro* con microorganismos posiblemente patógenos asociados con palmas de aceite afectadas por ML.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener microorganismos asociados a palmas afectadas por ML de la palma de aceite.
- Establecer una metodología que permita separar microorganismos saprofitos de posibles fitopatógenos asociados a la ML.
- Determinar la patogenicidad *in vitro* de microorganismos aislados de tejidos de palmas afectadas por la enfermedad ML.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de la investigación

5.1.1 Tejidos

El montaje y desarrollo de las pruebas de patogenicidad *in vitro* se fraccionaron por microorganismos, realizando las primeras pruebas para bacterias y posteriormente con hongos.

El diseño aplicado a las pruebas de patogenicidad *in vitro* fue un diseño completamente al azar. Para las pruebas con bacterias se montaron 28 tratamientos, ya que se seleccionaron 28 colonias bacterianas para inocular; por cada tratamiento se realizaron seis repeticiones. Utilizando como unidad experimental raquis de hoja nueve tomada de una palma sana adulta.

En el caso de hongos fueron seleccionadas 18 cepas, las cuales fueron utilizadas para las pruebas de patogenicidad *in vitro*. Se montaron 18 tratamientos cada uno con seis repeticiones.

Los ensayos con bacterias y hongos se evaluaron durante cinco días calendario, ya que los tejidos de palma se oxida fácilmente pues requiere una elevada concentración de agua. observando como variables periodo de incubación y porcentaje de daño de tejido durante los cinco días de evaluación, donde cada tratamiento contó con su respectivo control absoluto, el cual fue inoculado de la misma forma que los otros tratamientos con agua destilada.

5.1.2 Plántulas

El diseño aplicado fue completamente al azar teniendo en cuenta daño o severidad contra tiempo. Los tratamientos para bacterias fueron 28 tratamientos mas el control, pues fue el numero de colonias bacterianas seleccionadas para las pruebas de patogenicidad. Cada tratamiento contaba con seis repeticiones.

Para hongos se montaron 18 tratamientos mas el control, pues fue el numero de cepas seleccionadas para las pruebas de patogenicidad. Cada ensayo contó con cinco repeticiones y un control absoluto.

5.2 Localización

El trabajo experimental de toma de muestra de tejidos se llevo a cabo en las plantaciones Palmas del Casanare, Palmeras Santana, Palmar del Oriente, Palmeras Upía, Agropecuarias Guadualito y Guaicaramo, las cuales se encuentran ubicadas en zona del bajo Upía, departamento del Casanare en el oriente del país, región de la Orinoquía, localizado entre los 04° 17' 25" y 06° 20' 45" de latitud norte y los 69° 50' 22" y 73° 04' 33" de longitud oeste.

El procesamiento de los tejidos tomados de palmas afectadas en las plantaciones mencionadas anteriormente, aislamientos, purificación y la posterior identificación de los microorganismos fue realizado en el laboratorio de fitopatología de la plantación Palmas del Casanare, la cual se encuentra localizada en el municipio de Villanueva departamento del Casanare, entre los meses de junio a septiembre de 2007. La precipitación mensual para este periodo osciló entre 140 y 286 mm. La temperatura mínima fue de 21,3°C y la máxima de 27,1°C.

Las pruebas *in vitro* fueron montadas en el laboratorio de Fitopatología de Cenipalma ubicado en la ciudad de Villavicencio departamento del Meta. Esta fase se cumplió entre los meses septiembre a noviembre de 2007. La temperatura mínima de este periodo fue de 19°C y la máxima de 28°C.

5.2.1 Obtención de microorganismos asociados a palmas afectadas por ML

Se visitaron las cinco plantaciones ya mencionadas, en las cuales se ha reportado la presencia de la enfermedad. En cada una de estas plantaciones se buscaron palmas enfermas jóvenes con síntomas iniciales, los cuales se manifestaban por presentar un secamiento progresivo de los bordes del follaje, pérdida de brillo de los frutos y pudrición de raíces (figura 7). Quince palmas con

estas características fueron erradicadas con palín o con motosierra para extraer tejidos de parte baja, parte media y parte lateral del bulbo, pedúnculo de racimos, pedúnculo de inflorescencias y raíz (Figura 8). De cada muestra se determinó la fecha de recolección de tejidos, la fecha de siembra, la ubicación espacial, el lote, la línea, la palma, el estado de la muestra, el número consecutivo o código y variedad de la muestra; ésta información fue consignada en formatos (ver anexo 10.1 y10.2).



A



B

Figura 7. Síntomas iniciales de palmas jóvenes afectadas por ML (A) y, (B) secamiento de folíolos bajos.



Figura 8. Tejidos afectados por marchitez letal, muestras a procesar: A) raíces afectadas por Marchitez Letal; B) pedúnculo de racimos; C) parte lateral del bulbo; D) parte baja del bulbo; E) parte media del bulbo; F) pedúnculo de inflorescencias.

5.2.2 Metodología para separar microorganismos saprófitos de posibles fitopatógenos asociados a la ML

Se tomaron tejidos de raíces, pedúnculo de racimos, parte baja del bulbo (conecta con las raíces), parte media del bulbo y zona lateral del bulbo que (conecta con las hojas) de 5 palmas jóvenes sanas suministradas por la plantación GUAICARAMO (figura 9). Esta plantación está ubicada en el municipio de Barranca de Upía (Casanare) y se encuentra libre de la ML.

Se tomaron muestras de palmas sanas con el fin de tener un criterio de selección de los microorganismos a inocular mediante comparación morfológica, macroscópica y microscópica de los aislamientos obtenidos de palmas sanas contra palmas enfermas.

De cada muestra se determinó la fecha de recolección de tejidos, fecha de siembra, ubicación espacial, lote, línea, palma, estado de la muestra, número consecutivo o código y variedad (material) de la muestra; esta información fue consignada en formatos (anexo 10.1). El formato con el consolidado de las tomas de muestra se encuentra en anexo 10.2.



A



B



C



D



E



F

Figura 9. Palmas sanas y tejidos sanos: A) Palma joven sana; B) racimos; C) raíces; D) pedúnculo de inflorescencias; E) parte media del bulbo; F) parte baja del bulbo.

5.2.2.1 Toma de muestra

Las muestras de raíz se tomaron a una distancia de 50 cm del bulbo de la palma, se realizó una calicata de 40x40x40 cm. En el caso de muestras de raíz afectadas por ML se tomaron aquellas muestras que presentaban una pudrición inicial, las cuales se identificaban por que en el cilindro central se observaba un

color rojizo mientras la endodermis permanecía color hueso y no presentaba olor a fermento.

Las muestras de pedúnculo de racimos y de inflorescencias se tomaron de palmas jóvenes que presentaban sintomatología inicial de ML. Los racimos se caracterizaban por presentar desprendimiento de algunos de los frutos pero el pedúnculo de este presentaba buena coloración, aparentemente sano y no se apreciaba ningún olor a fermento. Las inflorescencias permanecían intactas lo mismo que su pedúnculo. Para las muestras del bulbo se examinó coloración y consistencia.

En el transporte de los tejidos tomados a partir de palmas sanas y enfermas se emplearon bolsas ziploc con cierre hermético en nevera de icopor con gel congelante, esto con el fin de mantener las características físicas y químicas del material, como humedad y concentración de nutrientes evitando la oxidación y fermentación de los tejidos.

5.2.2.2 Procesamiento de las Muestras

Se tomaron secciones de tejido de 4cm de largo, posteriormente se lavaron con agua y jabón tres veces con el fin de retirar rastros de materia orgánica. Para la desinfección de muestras se sumergieron los tejidos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto con agitación permanente, pasado este tiempo se sumergieron en etanol al 70% durante 30 segundos, con agitación; posteriormente las muestras fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de desinfectantes y luego secadas con papel toalla estéril (Cedeño, et al., 1993; Dhingra et al., 1995).

Finalmente para el aislamiento de bacterias las muestras se cortaron en trozos pequeños de 3 mm, y se sumergieron en tubos con agua destilada estéril por 30 minutos para promover la salida de bacterias. Luego se dispersó 0.1 ml de cada una de estas suspensiones en cajas de Petri con agar nutritivo (NA - DIFCO® Lab. 213000).

Para aislamiento de hongos, se tomaron las mismas secciones de tejido vegetal y se llevó a cabo el procedimiento de desinfección de tejidos mencionado anteriormente. Los tejidos después de cortados en trozos pequeños se sembraron directamente en los medios de cultivo agar Agua (AA) y PDAA (agar papa dextrosa + ácido láctico acidificado). Los medios AA, PDAA y NA se prepararon siguiendo las instrucciones estipuladas en la etiqueta del reactivo.

Las cajas que contenían las muestras fueron incubadas a 23°C, humedad y luz permanente en una incubadora (Precision Scientific, USA). La observación del crecimiento de hongos se realizó cada tres días después de sembradas las muestras en el medio y para bacterias se evaluaron a las 24 y 48 horas de haber sembrado los tejidos.

Adicionalmente, las muestras previamente desinfectadas fueron colocadas en cámaras húmedas: cajas petri de 9 cm, con toallas de papel estériles, humedecidos con 2 ml de agua estéril. Cada caja contenía en su interior una lámina porta objeto sobre la cual se depositaron los tejidos. Las cámaras con las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente (entre 24°C y 30°C) durante 7 días (Figura, 10), ésto con el fin de observar crecimiento macroscópico de hongos.



A



B

Figura 10. Cámaras húmedas con tejidos afectados por ML: A) parte media del bulbo; B) pedúnculo de inflorescencias.

5.2.3 Selección y Purificación de microorganismos

5.2.3.1 Bacterias

Los aislamientos bacterianos se incubaron a 29°C por un tiempo de 24 a 48 horas. Las colonias que crecieron en éstos diferentes medios fueron seleccionadas de acuerdo a las características culturales: color, tamaño, margen, elevación y brillo. Las colonias se purificaron transfiriéndolas tres veces consecutivas en los medios correspondientes de donde se aislaron.

Una vez purificadas las colonias se observaron las características morfológicas de la célula bacteriana: forma, presencia de flagelo y reacción de Gram. Para la clasificación bioquímica se realizó la prueba de hidróxido de potasio (KOH) al 3% la cual es una prueba indirecta de la reacción Gram (Suslow, *et al.*, 1982).

5.2.3.2 Hongos

Los tejidos sembrados en PDAA para obtención de hongos se incubaron a 23°C durante 96 horas, posteriormente se sometieron a un proceso de selección identificando mediante la observación al microscopio de micelio, tipo de esporas producidas, y coloración, posteriores a la realización de improntas con azul de lactofenol.

La caracterización morfológica de los deuteromicetos se basa principalmente en la estructura, composición y ultraestructura de las células conidiales, conidióforos, acérvulos, picnidios, esporodoquios, sinnemas y clamidosporas (Barnett y Hunter, 1998).

Además de establecer dichas características, se tuvo en cuenta otras características de tipo macroscópico como son: producción de pigmentos en el medio de cultivo, textura, tipo de micelio producido, tamaño de las colonias, tipo y velocidad de crecimiento, entre otros. Con esto se buscaba descartar hongos saprófitos, contaminantes y hongos que fueran parte de la biota del tejido y solo seleccionar para almacenar hongos que según bibliografía se reportan como fitopatógenos.

Ya que por métodos tradicionales algunos hongos no esporulan o son de difícil identificación, estas cepas también fueron seleccionadas para las pruebas de patogenicidad *in vitro*, pues algunos propágulos pueden llegar a ser infectivos, y fueron reportados como micelios no esporulados.

5.2.4 Almacenamiento de microorganismos

5.2.4.1 Almacenamiento de bacterias

Las colonias bacterianas seleccionadas de palmas sanas y enfermas se almacenaron mediante el proceso de almacenamiento de cultivos puros, específicamente a temperaturas bajas con glicerol al 70% en tubos eppendorf y se llevaron a refrigeración. (Cenipalma, Laboratorio Fitopatología).

Antes de ésto cada colonia bacteriana seleccionada se replicó cuatro veces en NA y se llevó a incubación durante 24 a 48 horas a 29°C, ésto con el fin de obtener una buena concentración de la colonia para almacenar. Por cada cepa para almacenar se utilizaron dos tubos eppendorf con glicerol al 70%.

5.2.4.2 Almacenamiento de Hongos

Ya seleccionados los hongos y purificados tanto los obtenidos a partir de palmas sanas como enfermas, se almacenaron en papel filtro estéril, mantenidos en sobres de papel kraft estériles y conservados a 4°C.

Se preparó el medio de cultivo específico para hongos, medio PDAA y se vertió en cajas petri. Posteriormente se colocaron de 10 a 15 cuadros de papel filtro esterilizados distribuidos uniformemente en la periferia de las cajas de petri que contenían el medio de cultivo seleccionado. La caja de petri que tenía el hongo a ser almacenado se replicó en medio PDAA y se llevó a incubación durante 96 horas; una vez desarrollado el hongo en el medio con una asa recta se tomaron estructuras del hongo y se impregnaron los discos de papel filtro con las estructuras del hongo. Las cajas sembradas se llevan a incubación, según los requerimientos de cada cepa, hasta que colonizaron plenamente los discos.

Colonizados estos discos de papel filtro, fueron retirados de la caja y colocados en sobres de papel aluminio. Los sobres de papel aluminio fueron guardados en sobres de papel Kraft previamente identificados y esterilizados. Este procedimiento ha sido diseñado por el Centro de Investigación de Palma de Aceite y se reporta en un protocolo el cual se denomina, Almacenamiento de Microorganismos de Interés.

Todos los aislamientos quedaron conservados en colección, mediante la técnica de papel filtro para hongos y glicerol al 70% para bacterias y guardados en el laboratorio de fitopatología de Cenipalma en Villavicencio.

5.3 Determinación de la patogenicidad *in vitro* de microorganismos seleccionados como posibles patógenos

5.3.1 Selección de microorganismos para pruebas de patogenicidad *in vitro*.

5.3.1.1 Bacterias

Con el fin de reducir el número de colonias bacterianas para las pruebas de patogenicidad *in vitro*. Las colonias almacenadas de palmas sanas y enfermas en tubos eppendorf se reactivaron en medio nutriente agar (NA). Cada colonia bacteriana se replicó en el medio masivamente. Se llevó a incubación a 29°C por 24 horas. Posteriormente a las 24 horas donde ya se observaba crecimiento masivo de las colonias bacterianas, se agruparon de acuerdo al estado sanitario del material vegetal de origen del cual se aisló la colonia (palmas sanas y enfermas) del tejido de donde se aisló la colonia (Figura 11).



Figura 11. Colonias bacterianas sembradas en medio NA; A) y B) Crecimiento a las 24 horas, observación macroscópica.

Las colonias obtenidas a partir de palmas sanas fueron comparadas macroscópicamente y microscópicamente con las colonias obtenidas a partir de tejidos de palmas enfermas (Figura 12), con el fin de seleccionar para las pruebas de patogenicidad *in vitro*, únicamente aquellas colonias que se presentaban en palmas enfermas. Los parámetros de selección se basaron en características culturales de cada colonia como tamaño, margen, elevación, brillo y olor y características microscópicas donde se observaba por coloración de Gram morfología y composición de la pared celular de las células bacterianas.



A



B

Figura 12. Comparación macroscópica de colonias bacterianas a las 24 h después de siembra en medio NA; A) Colonias bacterianas aisladas a partir de tejidos sanos y B) Colonias bacterianas aisladas a partir de tejidos enfermos.

Esta evaluación se realizó durante 24, 48 y 72 horas, agrupando las colonias que presentaban las mismas características culturales y microscópicas entre aislamientos obtenidos a partir de palmas sanas y palmas enfermas. Estas

colonias agrupadas con iguales características macroscópicas y microscópicas a las 72 horas fueron descartadas dejando solo un ejemplar de cada colonia.

5.3.1.2 Hongos

Las cepas de interés de palmas sanas y enfermas que se encontraban almacenadas en papel kraft, se reactivaron tomando un disco de papel filtro impregnado con estructuras de la cepa, con una pinza estéril y posteriormente se puso en agar-papa-dextrosa acidificado (PDAa); la incubación se hizo por un período de 8 días aproximadamente a una temperatura de 25°C.

Con el fin de disminuir las cepas a inocular en las pruebas de patogenicidad *in vitro*, las cepas obtenidas a partir de tejidos de palmas sanas fueron comparadas contra las cepas obtenidas a partir de tejidos de palmas enfermas observando características macroscópicas como producción de pigmentos en el medio de cultivo, textura, tipo de micelio producido, tamaño de las colonias, velocidad de crecimiento e identificación de la cepa y características microscópicas como morfología del micelio, tipo de esporas producidas y coloración, posteriores a la realización de improntas con azul de lactofenol. Adicionalmente a estas características se observaron y escogieron aquellas cepas que se reportaron como fitopatógenas según bibliografía.

Algunas cepas no permitieron ser identificadas pues no presentaban esporulación, observando las improntas con azul de lactofenol se presentaron solo estructuras vegetativas hifales. Según bibliografía estas estructuras también pueden ser infectivas, por tal razón los micelios sin esporular que fueron aislados de tejidos de palmas enfermas se seleccionaron para las pruebas de patogenicidad *in vitro* (Agris, 2005).

5.3.2 Prueba de Patogenicidad

Con el fin de determinar si alguno de los microorganismos, (hongos y bacterias) aislados a partir de tejidos de palmas afectadas por ML, es el causante de este disturbio se realizaron las pruebas de patogenicidad *in vitro*. Estas pruebas son

rápidas, efectivas y facilitan la detección de un agente infeccioso gracias a la rapidez con que se pueden observar sus efectos. (Agrios, 2005).

Para estas pruebas *in vitro* se utilizaron tejidos y plántulas de un mes.

5.3.2.1 Tejidos

Esta prueba se realizó con el fin de observar si algún microorganismo seleccionado (bacterias y hongos), presentaba capacidad patogénica generando síntomas de daño o necrosis de tejidos durante los cinco días de evaluación. Este síntoma fue evaluado como porcentaje y medido con una reglilla de 5cm de largo x 2cm de ancho, conformada por 40 cuadros que representaban el 100% de la reglilla, para la evaluación de porcentaje de tejido cada cuadro equivalía al 1% de daño o necrosis de tejido. A su vez se evaluó periodo de incubación de cada aislamiento durante el mismo tiempo de evaluación.

El número de tratamientos dependió de la cantidad de microorganismos seleccionados para las pruebas de patogenicidad *in vitro*. En el caso de bacterias fueron seleccionadas 28 colonias obtenidas a partir de tejidos de palmas afectadas por ML para utilizar en las pruebas.

Para hongos se seleccionaron 18 cepas, las cuales fueron aisladas de palmas afectadas por ML. Por cada tratamiento se montaron seis repeticiones tanto para raquis de hoja nueve como para raíz. Cada ensayo contó con su respectivo control absoluto.

Los tejidos seleccionados para las pruebas de patogenicidad *in vitro* fueron raíces primarias y raquis de hoja número nueve; estos tejidos fueron tomados de palmas sanas adultas (15 años) (Figura 13).



A



B



C



D

Figura 13. Toma de tejidos de palma sana adulta para pruebas *in vitro* A) Toma de raquis de hoja número nueve; B) Retiro de folíolos de hoja número nueve; C) Corte de raquis de hoja número nueve; D) Toma de raíces de palma adulta sana.

Una vez tomados los tejidos a inocular, se sometieron a desinfección se lavaron con agua y jabón tres veces con el fin de eliminar la mayor cantidad de contaminantes que pudieran tener. Posteriormente en un ambiente aséptico se cortaron trozos de raquis de hoja número nueve de 2 cm de ancho por 5 cm de largo y de raíz de 5cm de largo. Para la desinfección de muestras se sumergieron los tejidos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto con agitación permanente, pasado este tiempo se sumergieron en etanol al 70% durante 30 segundos con agitación, las muestras fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de desinfectantes y luego secadas con papel toalla estéril (Figura 14) (Cedeño, *et al.*, 1993; Dhingra, *et al.*, 1995).



A



B



C



D

Figura 14. Procesamiento de tejidos de palma sana adulta para pruebas *in vitro* A) Corte de trozos de raquis para inocular; B) desinfección de tejidos de raquis; C) Lavado de raíces de palmas adultas sanas para inocular D) desinfección de raíces de palma adulta sana.

5.3.2.1.1 Inoculación en trozos de raíces y raquis

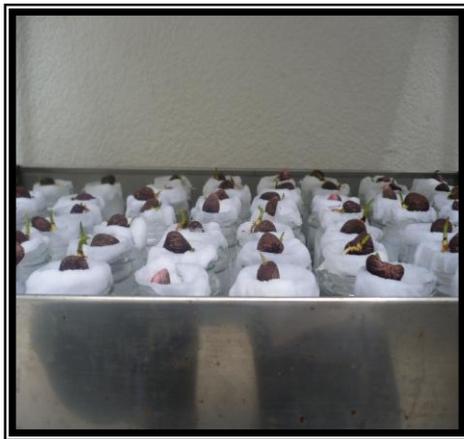
Raíces y raquis seleccionados para las pruebas de patogenicidad *in vitro* fueron inoculados con los aislamientos de hongos y bacterias a través de una herida realizada con aguja de disección en el centro de cada uno de los tejidos. Inmediatamente después de la inoculación los dos tejidos se colocaron en cámara húmeda (90-100%); las cámaras húmedas se mantuvieron a una temperatura de 20°C (Figura 15) y se revisaron diariamente durante cinco días para observar si se presentaba algún tipo de daño o necrosis de tejido, periodo generacional y velocidad de colonización.



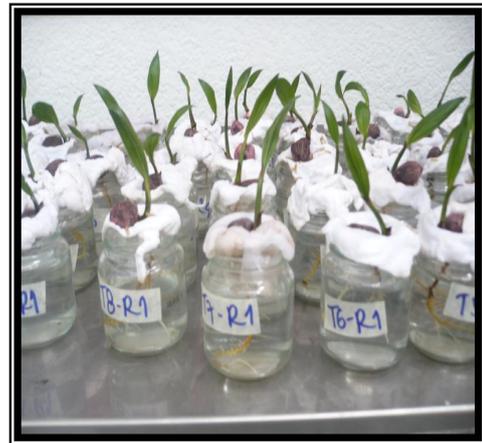
Figura 15. Procesamientos tejidos a inocular: A) y B) Montaje cámara húmeda con trozos de raquis hoja numero nueve. C) y D) Montaje cámara húmeda con raíces sanas.

5.3.2.2 Plántulas de un mes

Semillas germinadas fueron establecidas en frascos de vidrio bajo condiciones de laboratorio durante un mes, utilizando como único sustrato agua (Figura 16).



A



B

Figura 16. Semillas y plántulas montadas en recipientes de vidrio; A) semillas recién germinadas; B) Plántulas de un mes para inocular.

Esta prueba se realizó con el fin de observar si algún microorganismo seleccionado (bacterias y hongos), tenía la capacidad de producir algún tipo de daño (clorosis, pudrición de raíces o necrosis de tejidos) en las plántulas. Estas fueron evaluadas durante cuatro lapsos de 24 horas durante un lapso de 45 días una vez por semana.

El número de tratamientos dependió de la cantidad de microorganismos seleccionados para las pruebas de patogenicidad *in vitro*. En el caso de bacterias fueron seleccionadas 28 colonias obtenidas a partir de tejidos de palmas afectadas por ML, para utilizar en las pruebas *in vitro*. Para hongos se seleccionaron 18 cepas, las cuales fueron aisladas de palmas afectadas por ML.

5.3.2.2.1 Inoculación en plántulas

Los aislamientos de hongos fueron incrementados en medio de cultivo agar-papa-dextrosa acidificado (PDAa), posteriormente se ajustó a una concentración de 1×10^6 esp/ml utilizando el hemacitómetro y fueron aplicados a los frascos de vidrio reemplazando el sustrato (agua) por el inóculo a evaluar. Se causó una herida en algunas raíces para facilitar la colonización y el ingreso del microorganismo disminuyendo el periodo de incubación, observando que las raíces estuvieran inmersas en el inóculo.

Los aislamientos de bacterias fueron incrementados masivamente en AN durante 24 horas y el ajuste de la concentración se realizó por el método de turbidez óptica con el estándar de Mac Farland de 1×10^8 cel/ml (tubo numero 3). Posteriormente las plántulas fueron removidas de los frascos de vidrio que contenían como sustrato agua para ser reemplazado por el inóculo bacteriano. Se causó una herida en algunas raíces para facilitar el ingreso del microorganismo (Figura 17).



A



B

Figura 17. Plántulas montadas en recipientes de vidrio; A) y B) Plántulas de dos meses inoculadas con los microorganismos, como único sustrato.

5.4 Análisis estadístico

5.4.1 Tejidos

Para el análisis estadístico, los datos de periodo de incubación se compararon para los dos tejidos raíz y raquis, con la ayuda de la técnica de análisis de sobrevivencia (AS) (SAS, 1999). Esta prueba permitió identificar la forma como se presentaba la aparición de signos de las poblaciones de microorganismos inoculados en estos dos tejidos, e identificar si existen diferencias en los tiempos a aparición de estos signos sobre los dos tejidos inoculados.

Para la evaluación de porcentaje de daño de tejido o necrosis se aplicó ANOVA con un nivel de significancia $p=0.05$. En el caso de raquis inoculado con microorganismos, para los cinco tiempos se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y para comparación de los aislamientos se utilizó la prueba Tukey.

5.4.2 Plántulas

Se evaluó la presencia de daño (clorosis, pudrición de raíces, necrosis) en base a una escala de severidad (Tabla 1). Las plántulas fueron evaluadas durante 45 días una vez por semana. Dada la naturaleza de los datos se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de comparación de Tukey aplicada a los rangos de la variable, con un $P=0,1$, para cada tiempo de evaluación.

Grado	Síntomas
0	Tejido Sano
1	Clorosis
2	Clorosis + Pudrición de raíces
3	Clorosis + Pudrición raíces + Necrosis

Tabla 1. Escala presencia de daño (clorosis, pudrición de raíces, necrosis) en en pruebas in Vitro.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los microorganismos aislados y seleccionados para las pruebas de patogenicidad, se creó un banco de cepas y colonias bacterianas que serán reactivadas e inoculadas en la siguiente fase del proyecto identificación del agente causal de la Marchitez Letal, en el cual se inocularan plántulas de pre-vivero y vivero con estos microorganismos almacenados.

6.1 Muestreo, caracterización morfológica macroscópica y microscópica de colonias bacterianas y hongos

Todos los aislamientos realizados a los tejidos de las seis plantaciones incluyendo muestras de tejidos de palmas sanas, desarrollaron colonias bacterianas y hongos.

6.1.1 Bacterias

El total de bacterias encontradas entre tejidos de palmas sanas y enfermas fue de 182 colonias (Tabla 2), de las cuales 45 fueron obtenidas a partir de tejidos sanos y 137 colonias bacterianas de tejido enfermo (Figura 18). De los 43 tejidos de palmas sanas, 28 fueron Gram negativas y 15 Gram positivas (tabla 3); en este caso predominaron colonias bacterianas evaluadas morfológicamente como Gram negativas.

De las 137 colonias bacterianas aisladas de tejidos afectados por Marchitez Letal, 25 colonias se identificaron como Gram positivas y 112 Gram negativas (Tabla 4), las bacterias que se clasificaron morfológicamente como Gram negativas predominaron en el caso de tejidos enfermos con un porcentaje de diferencia respecto a los aislamientos clasificados como Gram positivos de 19% . La diferencia marcada entre Gram negativas y positivas sugiere que podría encontrarse un número significativo de bacterias parasíticas ya que según Hayward (1983) el mayor número de bacterias patogénicas a plantas son Gram negativas.

Tabla 2. Número total de bacterias por estado de la muestra y resultados prueba de Gram.

	Nº bacterias	Gram -	Gram +
SANIDAD			
Sana	45	28	15
Enferma	137	112	25
	182		22,00%
Bacterias	182	140	40

Figura 18. Total bacterias agrupadas por estado de la muestra y resultados coloración de Gram.

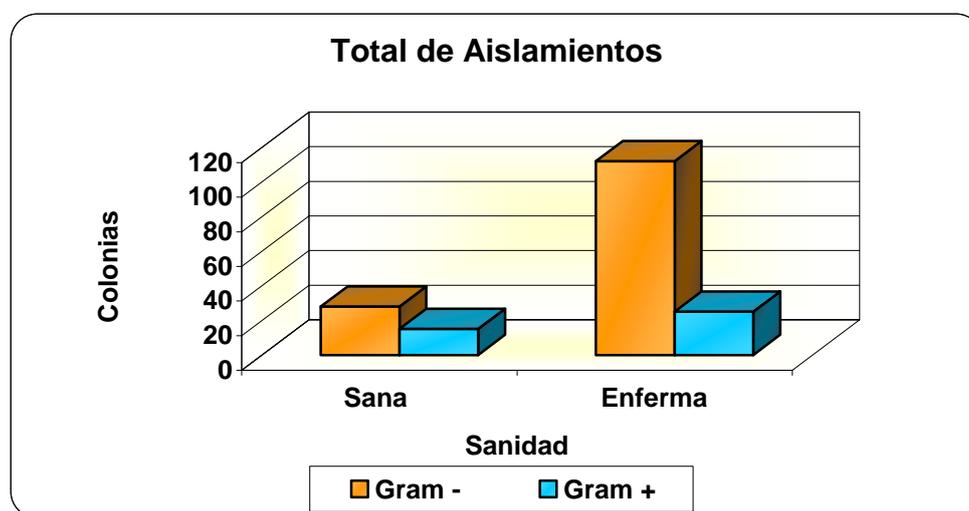


Tabla 3 Total bacterias aisladas de tejidos sanos, agrupada por tejido y resultados coloración de Gram.

TEJIDO	SINTOMA	COLONIAS BACTERIANAS	GRAM	
			Gram +	Gram -
RAIZ	SANA	7	3	4
P. RACIMOS	SANA	8	2	6
P. INFLORES.	SANA	9	5	4
P. BAJA BULBO	SANA	5	1	4
P. MEDIA BULBO	SANA	6	2	4
P. LATERAL BULBO	SANA	8	2	6
TOTAL COLONIAS		43 (100%)	15 (35%)	28 (65%)

Tabla 4. Total colonias bacterianas aisladas de tejidos enfermos, agrupada por tejidos y resultados coloración de Gram.

TEJIDO	SINTOMA	COLONIAS BACTERIANAS	GRAM	
			Gram +	Gram -
RAIZ	ENF. ML	25	4	21
P. RACIMOS	ENF. ML	11	5	6
P. INFLORES.	ENF. ML	8	2	6
P. BAJA BULBO	ENF. ML	31	7	24
P. MEDIA BULBO	ENF. ML	40	4	36
P. LATERAL BULBO	ENF. ML	22	3	19
TOTAL COLONIAS		137	25	112

El total de bacterias fueron agrupadas según sanidad vegetal, tejidos de donde se aislaron las colonias y configuración morfológica; al agrupar las bacterias según su configuración morfológica, se obtuvieron muchas colonias bacterianas entre palmas sanas y enfermas. Para reducir el número de colonias se compararon los aislamientos obtenidos a partir de tejidos enfermos contra aislamientos bacterianos obtenidos a partir de tejidos sanos, como se observa en la figura 21, donde se detalla el proceso de comparación y las características de selección entre colonias aisladas a partir de tejidos sanos contra colonias obtenidas a partir de tejidos enfermos. También en la figura 21 se observa que en la primera selección de aislamientos bacterianos a las 24 horas obtenidos a partir de tejidos de palma enferma, se descartaron 95 colonias bacterianas que se presentaban tanto en tejidos enfermos como en tejidos sanos, quedando 42 colonias bacterianas aisladas de tejidos enfermos, para la evaluación a las 48 horas. En la última evaluación a las 72 horas se contaban con 34 colonias bacterianas de tejido enfermo y 22 colonias bacterianas de tejido sano. Estas colonias se compararon entre sí para observar similitudes macroscópicas; las colonias bacterianas que presentaban similitudes entre aislamientos de tejidos sanos y enfermos se descartaron. En total fueron seleccionadas 28 colonias bacterianas aisladas de palmas afectadas por ML para las pruebas de patogenicidad, en donde 20 fueron Gram negativas y 9 Gram positivas.

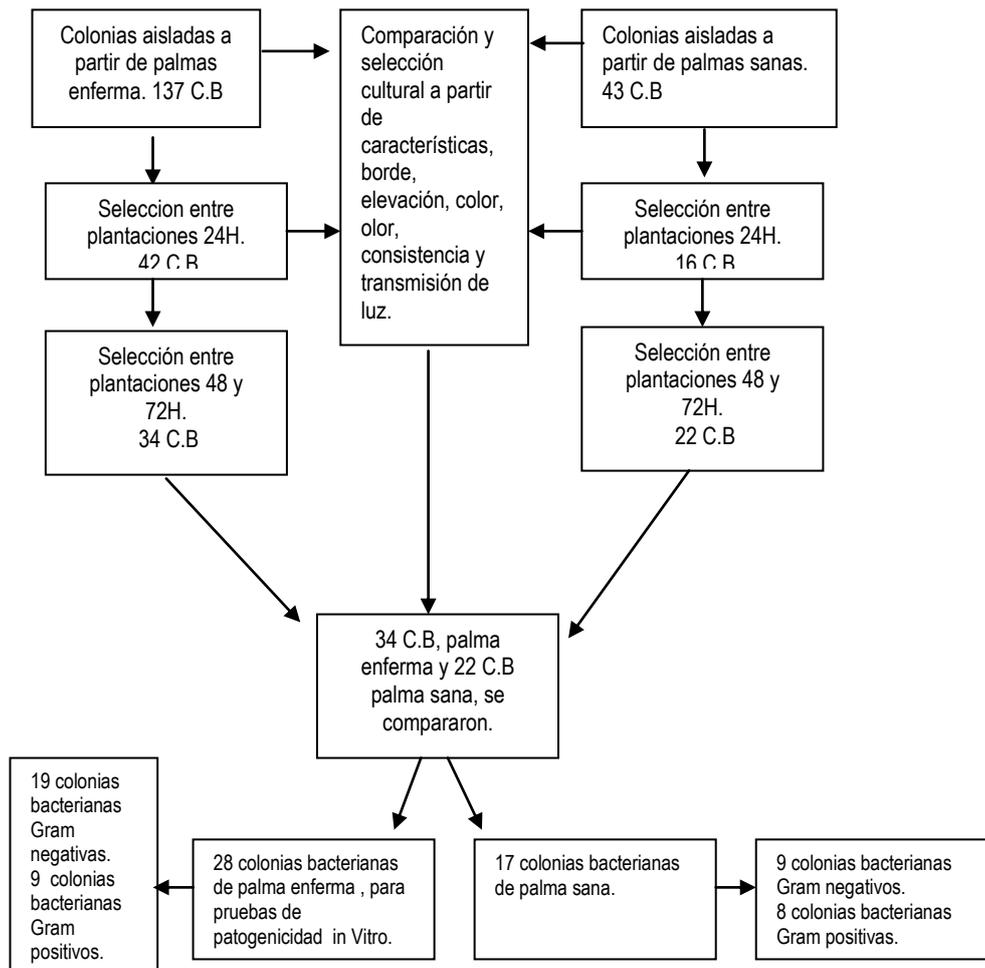


Figura 21. Proceso de selección y resultados de colonias bacterianas para pruebas de patogenicidad *in vitro*.

Al realizar este proceso de selección en general, la morfología y color de las colonias aisladas de tejidos sanos y enfermos que más predominó en todos los tejidos fue la forma redondeada, con bordes lisos, elevación convexa y color crema claro brillante. Las segundas colonias bacterianas que se presentaron en grandes cantidades tanto en tejido sano como enfermos fueron las que presentaban características como coloración blanca clara, brillante, redonda, lisa y plana (Tablas 5 y 6).

Así mismo en los medios de NA utilizados para aislar bacterias a partir de tejidos enfermos, se observaron bacterias que producían un color tornasol o pigmento fluorescente con olor a uva. Hay que destacar que este tipo de colonias solo fue observado en los aislamientos de tejido enfermo.

Tabla 5. Bacterias aisladas de tejido sano en seis tejidos y clasificación características macroscópicas.

Color, configuración, margen y elevación	Gram negativas						Gram positivas					
	Raiz	P.B.B	P. infl	P.r	P.M.B	P.L.B	Raiz	P.B.B	P. infl	P.r	P.M.B	P.L.B
	CCB – RLC	3	1	0	6	2	5	2	1	2	2	1
ACB – RLC	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
CTB – ROP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CCB – ROP	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
BCB – RLP	0	3	3	0	2	0	1	0	2	0	0	0
CCO – ROP	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1CCB – RLC: Crema Claro Brillante – Redonda Lisa Convexa; 2ACB – RLC: Amarillo Claro Brillante – Redonda Lis Convexa; 3CTB – ROP: Crema Tornasol Brillante – Redonda Ondulada Plana; 4CCB – ROP: Crema Claro Brillante – Redonda Ondulada Plana; 5BCB – RLP: Blanco Claro Brillante – Redonda Lisa Plana y 6CCO – ROP: Crema Claro Opaca – Redonda Ondulada Plana.

Tabla 6. Bacterias aisladas de tejido enfermo en seis tejidos y clasificación características macroscópicas.

Color, configuración, margen y elevación	Gram negativas						Gram positivas					
	Raiz	P.B.B	P. infl	P.r	P.M.B	P.L.B	Raiz	P.B.B	P. infl	P.r	P.M.B	P.L.B
	CCB – RLC	17	13	2	6	23	7	1	1	0	1	1
ACB – RLC	0	0	0	0	8	3	1	0	0	0	0	1
CTB – ROP	4	7	0	0	5	2	0	0	0	0	0	0
CCB – ROP	0	1	0	0	0	5	1	4	0	0	1	1
BCB – RLP	0	3	3	0	0	2	1	0	2	4	0	0
CCO – ROP	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	2	0

1CCB – RLC: Crema Claro Brillante – Redonda Lisa Convexa; 2ACB – RLC: Amarillo Claro Brillante – Redonda Lis Convexa; 3CTB – ROP: Crema Tornasol Brillante – Redonda Ondulada Plana; 4CCB – ROP: Crema Claro Brillante – Redonda Ondulada Plana; 5BCB – RLP: Blanco Claro Brillante – Redonda Lisa Plana y 6CCO – ROP: Crema Claro Opaca – Redonda Ondulada Plana.

6.1.2 Hongos

De los aislamientos caracterizados en total para hongos se reportaron 77 cepas entre palmas sanas y enfermas, de las cuales 23 cepas fueron obtenidas a partir de palmas sanas y 54 cepas de tejidos de palmas afectadas por ML.

Con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter (1998) y la clave para *Fusarium* (Nelson et al., 1983) 12 aislamientos, de los 23 caracterizados y aislados de palmas sanas, presentaron las mismas características culturales y microscópicas de algunas especies de *Fusarium sp.* Los 11 aislamientos restantes se reportaron como hongos no identificados, pues no presentaban esporulación alguna dificultando su clasificación microscópica.

Todos los aislamientos aquí reportados obtenidos de tejidos afectados por Marchitez Letal fueron seleccionados por cumplir los parámetros de evaluación antes descrito para selección de cepas a inocular en pruebas de patogenicidad. En el caso de las 54 cepas (Tabla 7), obtenidas de tejidos afectados por ML, 31 de ellas presentaron características macroscópicas como su crecimiento en medio agar-papa-dextrosa + ácido (PDAa), el cual es relativamente rápido y característico por la variedad de colores que presenta su micelio al desarrollarse y microscópicas de algunas especies de *Fusarium sp* (Figura 22 A), observando macroconidias curvadas, pluriseptadas, con una célula apical más o menos puntiaguda y algunas microconidias (Figura 22B). El género fungoso que se aisló con mayor frecuencia fue *Fusarium sp.* que se encontró en todos los tejidos de las palmas enfermas e invariablemente en las seis plantaciones en las que se hicieron los muestreos; sin embargo se observó que apareció en tejidos de la parte superior del dosel de las palmas, aislándose de tejidos como pedúnculos de racimos, pedúnculos de inflorescencias y las diferentes zonas del bulbo. *Fusarium sp* es un microorganismo fitopatógeno del suelo y causa pudrición de raíces y pudriciones basales en algunos cultivos; por este comportamiento fitopatológico se seleccionó para las pruebas de patogenicidad *in vitro*.

Aislamientos de hongos sin identificar, fueron los siguientes en frecuencia de aparición aislándose en total 15 cepas, los cuales se aislaron de los seis tejidos muestreados. Estas cepas fueron utilizadas para las pruebas de patogenicidad *in*

vitro. Llama la atención la aparición de 5 cepas de *Cephalosporium sp*, el cual fue aislado de tejidos enfermos, específicamente de parte baja del bulbo (tabla 7). Este microorganismo ha sido reportado como fitopatógeno causando marchitez tardía y necrosis vascular en cultivos de maíz, (Shurtleff, M.C, 2002) ambas enfermedades causan la muerte de la planta.

Adicionalmente se aislaron de tejidos enfermos 3 cepas de *Thielaviopsis* (tabla 7), las cepas obtenidas en medio PDAa presentaron a los pocos días de siembra micelio algodonoso grisáceo característico de *Thielaviopsis sp*, para corroborar la presencia de este microorganismos se realizaron improntas con azul de lactofenol observando características microscópicas como clamidosporas en forma alargada septadas y oscuras. Algunas especies de *Thielaviopsis sp* se han reportado como fitopatógenas (*Thielaviopsis basicota*) de gran importancia en algunos cultivos agrícolas; esta especie ataca a nivel radicular, colonizando e impidiendo su funcionamiento correcto presentando sintomatología en la parte aérea de la planta. Por lo anterior y por aislarse a partir de tejidos de plantas enfermas se seleccionaron para las pruebas de patogenicidad.

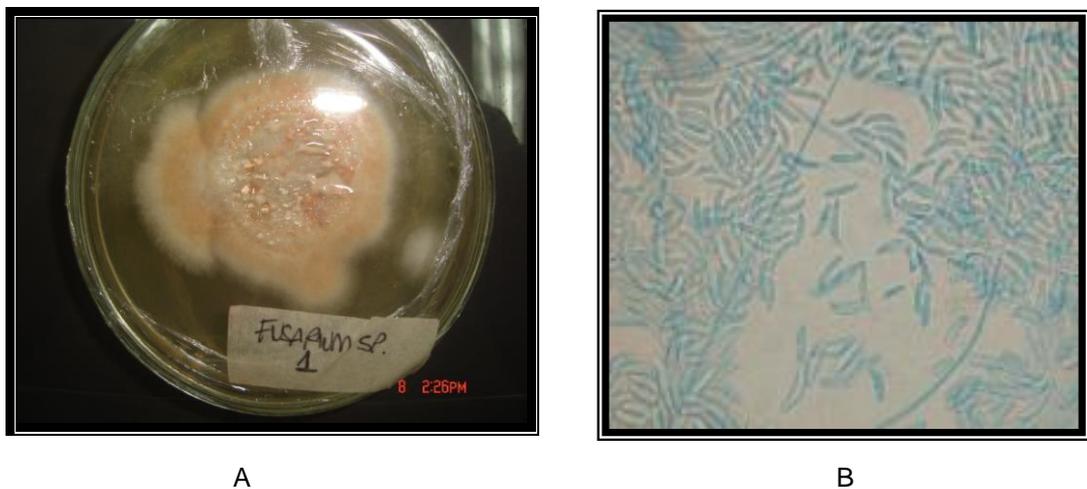


Figura 22. Aislamiento de *Fusarium sp*, de tejidos enfermos; A) Características macroscópicas, micelio algodonoso color salmón; B) Macroconidias curvadas con terminación en punta (40X).

Tabla 7. Consolidado hongos aislados de palmas con síntomas de Marchitez letal por tejido.

TEJIDO	Microorganismos			
	<i>Fusarium sp</i>	<i>Thielaviopsis</i>	<i>Cephalosporiu</i>	<i>Sin identificar</i>
Raíz	14	1	0	4
P.Racimos	6	0	0	0
P.Inflorescen	2	0	0	3
P.Baja bulbo	5	1	5	3
P.Media bulbo	2	0	0	1
P.Lateral bulbo	3	1	0	4

6.2.2 Pruebas de patogenicidad

La técnica empleada para el aislamiento de microorganismos posiblemente patógenos resulta eficiente para la obtención de colonias bacterianas y hongos, logrando aislar frecuentemente del material vegetal utilizado un tipo de colonias bacterianas de color cremoso y diferentes especies de *Fusarium sp*.

6.2.2.1 Periodo de incubación bacterias

Los tejidos de raíces y raquis inoculados con los 28 aislamientos bacterianos para las pruebas *in vitro* se evaluaron durante cinco días en cámara húmeda.

Esta prueba permitió identificar la forma como se presentaba la aparición de signos de los 28 tratamientos y observar si existía diferencia entre los tiempos de aparición entre raíz y raquis.

Con base en el ensayo de inoculación de los 28 tratamientos en los dos tejidos y en la subsiguiente observación histológica se observó que los tratamientos de raíz inoculados con colonias bacterianas, iniciaron su desarrollo a partir del día tdo, como se aprecia en la figura 26, siendo que el 60% de los aislamientos inoculados en raíces presentaron al segundo día la aparición de los primeros signos sobre este tejido. Comparado con los tejidos de raquis inoculados con los 28 aislamientos bacterianos, al segundo día de inoculados los trozos, se observó la aparición de signos del 30% de las colonias bacterianas inoculadas sobre el

tejido de raquis. La comparación de las distribuciones de los tiempos a presentar las colonias bacterianas algún signo en los dos tejidos correspondientes permite observar que hay diferencia entre los tiempos de aparición de signos de los aislados en los tejidos, siendo que el tejido que presenta más aparición de signos a menor tiempo de los microorganismos inoculados fue raíz. Esta extensión del período de incubación de los tratamientos sobre el tejido de raquis sugiere o una menor virulencia del patógeno o una mayor resistencia de los materiales bajo las condiciones del actual experimento, no permitiendo el rápido desarrollo de la colonia bacteriana sobre el tejido ya sea por la concentración y disponibilidad de nutrientes. Bajo las condiciones de pruebas in Vitro con tejidos de palma de aceite, el tejido que proporciona un rápido desarrollo de los microorganismos a estudiar es raíz, de acuerdo a lo indicado por varios autores (Agrios, 2005).

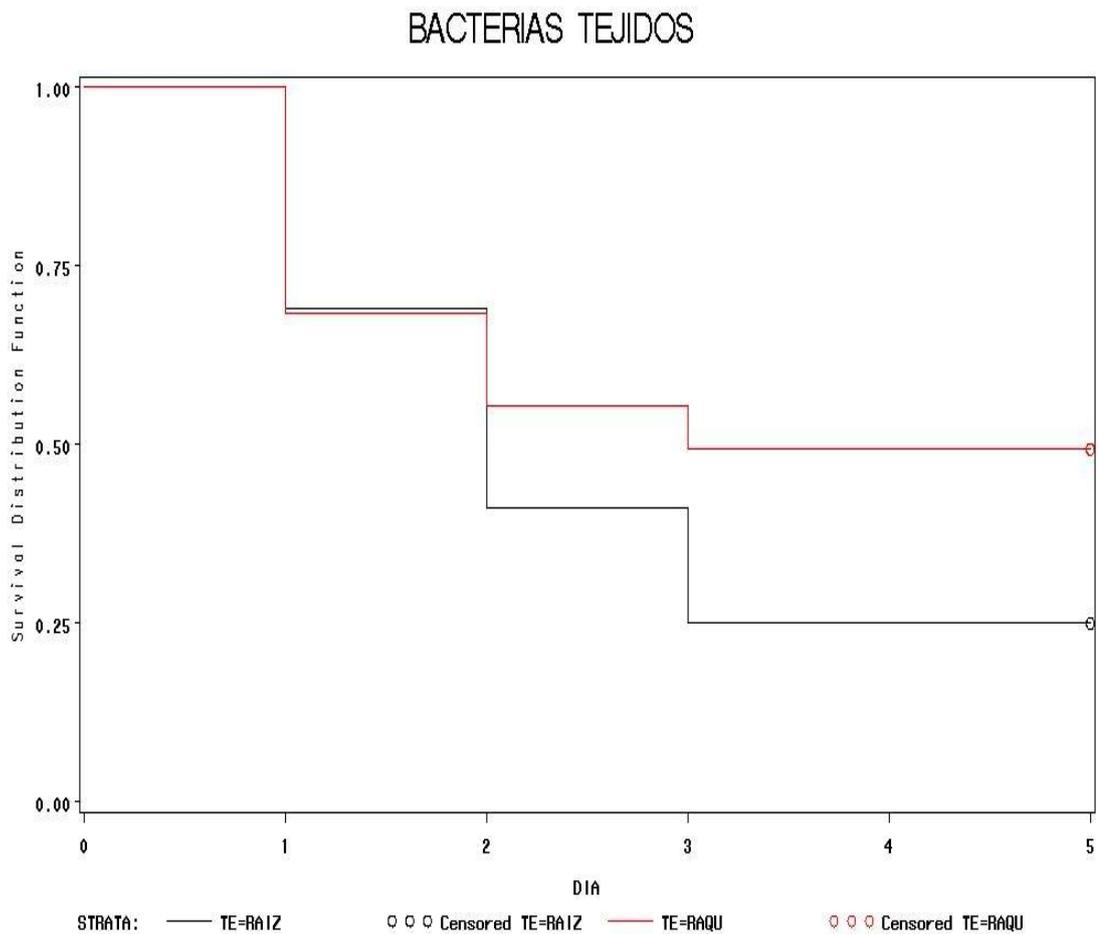


Figura 26. Curva de Análisis de sobrevivencia entre tejidos de raquis y raíz inoculados con bacterias.

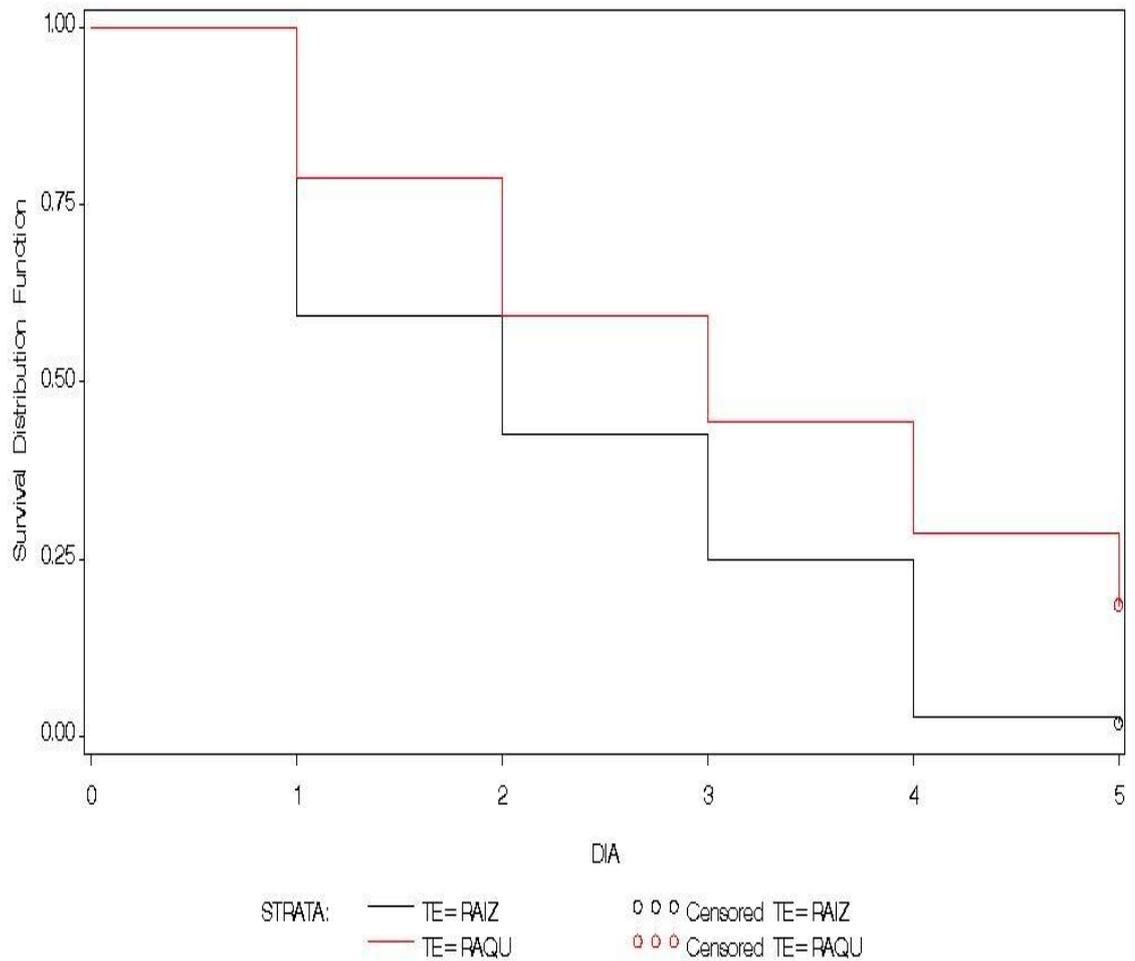
Adicionalmente según la prueba de análisis de sobrevivencia se encontraron diferencias en cuando a la variable periodo de incubación en base a tiempo entre los dos tejidos. Según las pruebas de Log-Rank y Wilcoxon, estos valores son estadísticamente diferentes con $P < 0,0001$, (anexo 10.8).

6.2.2.2 Periodo de incubación hongos

Los tejidos de raíces y raquis inoculados con las 18 cepas seleccionadas para las pruebas *in vitro* se evaluaron durante cinco días, observando periódicamente hasta registrar el día que se manifestó los primeros signos y una o varias estructuras de las cepas inoculadas.

Con las 18 cepas inoculadas en tejidos de raíz y raquis, se evaluó la aparición de signos durante cinco días observando si existía diferencia en los tiempos de aparición entre estos dos tejidos. Para raquis el 50% de los hongos presentaron signos o estructuras a los tres días después de la inoculación. Comparando con los ensayos de inoculación en raíz donde se observa que a los 3.5 días el 75% de los tratamientos presentaron signos o estructuras (Figura 27). Estos resultados de acuerdo al periodo de incubación de los hongos sobre el tejido, evidencia como primera medida que el hospedante en este caso el tejido, no proporcionó al microorganismo los nutrientes necesarios o no están disponibles para poder invadir el tejido y dos que las cepas inoculadas no causan ningún tipo de daño en el tejido (Agrios, 2005).

PRUEBAS HONGOS TEJIDOS



27. Curva de Análisis de sobrevivencia entre tejidos de raquis y raíz inoculados con hongos.

Igualmente se encontraron diferencias estadísticas en cuando a la variable periodo de incubación en base a tiempo entre los dos tejidos se trata, como lo muestran los análisis de sobrevivencia (AS). Según las pruebas de Log-Rank y Wilcoxon, estos valores son estadísticamente diferentes con $P < 0,0001$, (anexo 10.9).

6.2.3 Porcentaje daño de tejido o necrosis

6.2.3.1 Bacterias

Las pruebas de patogenicidad permitieron discriminar el grado de patogenicidad de las 28 colonias bacterianas aisladas de tejidos enfermos.

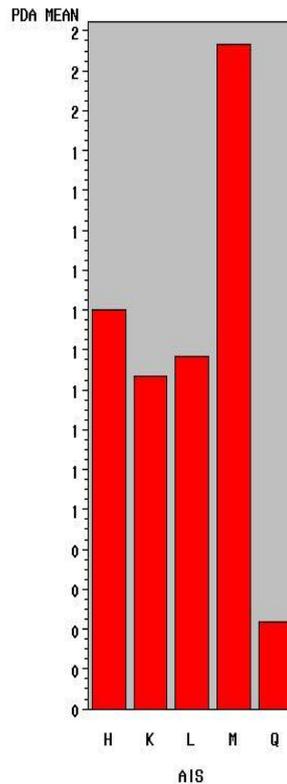
En el ensayo con raíces se durante los cinco días de evaluación se realizaron observaciones superficiales de daños o necrosis de la corteza, al quinto día se hizo una disección manual de las raíces para observar daño o necrosamiento total de tejidos.

Como se observa en la figura 28, de las 28 colonias bacterianas inoculadas en trozos de raíces solo cinco aislamientos arrojaron algún tipo de daño de tejido, el tratamiento mas representativo en este ensayo fue el tratamiento M, el cual fue aislado de pedúnculo de racimos y morfológicamente clasificado como bacilo Gram negativo. Produciendo el 20% de daño sobre el cilindro central de la raíz. Como se observó al realizar la disección de las raíces los daños reportados no presentaron características de pudrición ni olor a fermento, se clasificaron como daños leves al no llegar a necrosar el 50% o mas de las raíces pues en su mayoría solo ocupaban el 10 o 20% de daño.

Ningún síntoma de daño o necrosis que presentaban las raíces inoculadas con los tratamientos o colonias bacterianas, se relacionaron con los síntomas de pudrición característicos de ML.

De los tratamientos ningún organismo altero la función del tejido, no afecto células de este y por consiguiente no presentó debilitamiento o daño.

DANO (%) RAIZ BACTERIAS



Aislamientos o Tratamientos

Figura 28. Porcentaje de daño de raíz inoculada con bacterias aisladas de tejidos afectados por Marchitez Letal.

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la variable porcentaje de daño de tejido se trata, como lo muestran los resultados del análisis de varianza ANOVA (anexo 10,10).

Inicialmente se puede observar que no hay diferencias estadísticamente significativas, ya que las colonias bacterianas inoculadas no causaron ningún estrés, ni daño de tejido esto se observó al realizar los cortes para evaluar internamente el estado sanitario de los tejidos. Ninguno de los tejidos inoculados presentó olor o pudrición característica de la enfermedad o de importancia.

6.2.3.2 Hongos

En el caso de ensayo con hongos los 18 aislamientos fueron inoculados en raíz esperando observar la capacidad patogénica de los aislamientos frente al tejido. Como primera medida se presentó esporulación superficial en la corteza de las raíces de cada uno de los tratamientos inoculados (Figura 29). Posteriormente a esto se realizó una disección manual de las raíces para observar daño o necrosamiento total o parcial de los tejidos. Al realizar este proceso no se observó en ninguno de los tratamientos daño interno o necrosis de algún tejido interno. Ninguna de las cepas inoculadas afectó las células del tejido ni causó debilitamiento o daño, por lo tanto, ninguna de estas cepas se considera patógeno de este tejido.

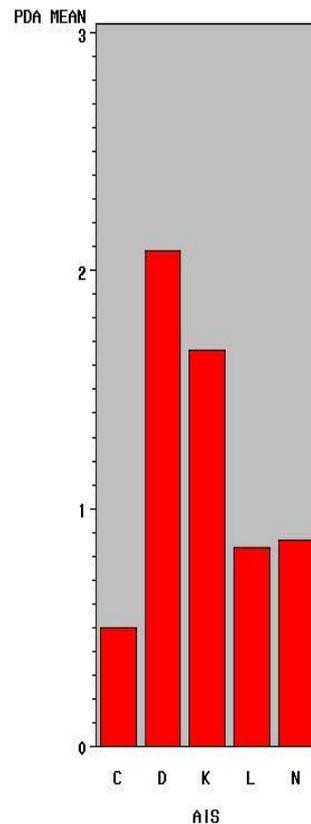


Figura 29. Observación de estructuras hifales sobre tejido de raíz inoculado.

Como se observa en la figura 30, de los 18 tratamientos evaluados cinco de ellos presentaron daño de tejido en raíz. Los daños observados no se relacionan con síntomas de la enfermedad no se presentó pudrición ni olores extraños, pero si

se observó un cambio de pigmentación en un porcentaje del cilindro central de la raíz. En el caso del tratamiento con *Fusarium sp.*, el cual fue representado con la letra D (Figura 30), se observó que el microorganismo causó un daño leve en el cilindro central de la raíz (Figura 31).

DANO (%) RAIZ HONGOS



Este hecho se debe a que este tejido no es el hospedante ideal del patógeno, existen patógenos que solo desarrollan síntomas en raíces o en tallos o en hojas. Siendo clasificados entre los parásitos obligados pues requieren un tipo de tejido específico para desarrollarse y causar algún tipo de síntoma sobre el tejido si los clasificamos como posibles fitopatógenos, pero para los aislamientos restantes que no causaron ningún tipo de daño sobre el tejido pueden ser clasificados como saprofitos (Agrios, 2005).



A



B

Figura 31. Raíces inoculadas; A) Control repetición una, dos y tres; B) Disección de raíces inoculadas con *Fusarium sp*, en la repetición uno se observa daño de tejido del 20%, en el cilindro central igualmente se observa en la repetición dos pero a menor porcentaje.

Aislamientos de hongos sin identificar fueron los cuatro tratamientos restantes que al inocular en raíz causaron daño interno en el tejido. La relación que presentaron estos aislamientos entre sí, es que fueron obtenidos a partir de la zona del bulbo de palmas afectadas por ML.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de acuerdo a la variable porcentaje de daño causado por uno de los aislados sobre el tejido, como lo muestran los resultados de la prueba Kruskal-Wallis, no paramétrica para diseños completamente al azar (anexo 10.11).

6.2.4 Porcentaje daño o necrosis de tejido en raquis

6.2.4.1 Bacterias

La evaluación se realizó durante cinco días, en los cuales se observaba superficialmente desarrollo de bacterias en el tejido, presencia y medición si se evidenciaba algún tipo de daño superficial. Al quinto día se realizó una disección manual de los trozos de raquis para evaluar el estado fitosanitario de los tejidos internos de cada uno de los raquis inoculados con bacterias. En la figura 32A, se ilustran los trozos de raquis sin inocular (controles), que igualmente se les realizó la punción con asa recta. En la figura 32B se observa el tratamiento 26, el cual fue inoculado en el centro con algunas colonias bacterianas por seis repeticiones, donde observa un daño sobre el tejido. Estos resultados sugieren que algunos daños observados en el tejido de raquis se produce al introducir el asa con las colonias bacterianas causando un tipo de estrés del tejido causando procesos de oxidación en la zona donde se inoculó la colonia bacteriana.

Adicionalmente en la figura 32C y D se observan los raquis después de la disección manual. En ninguno de los tratamientos se evidenció necrosis o daño significativo de tejidos. Tanto la apariencia externa como interna de los tejidos de raquis resultaron idénticos a los observados en los testigos, los cuales fueron inoculados con agua estéril (Figura 32 A).

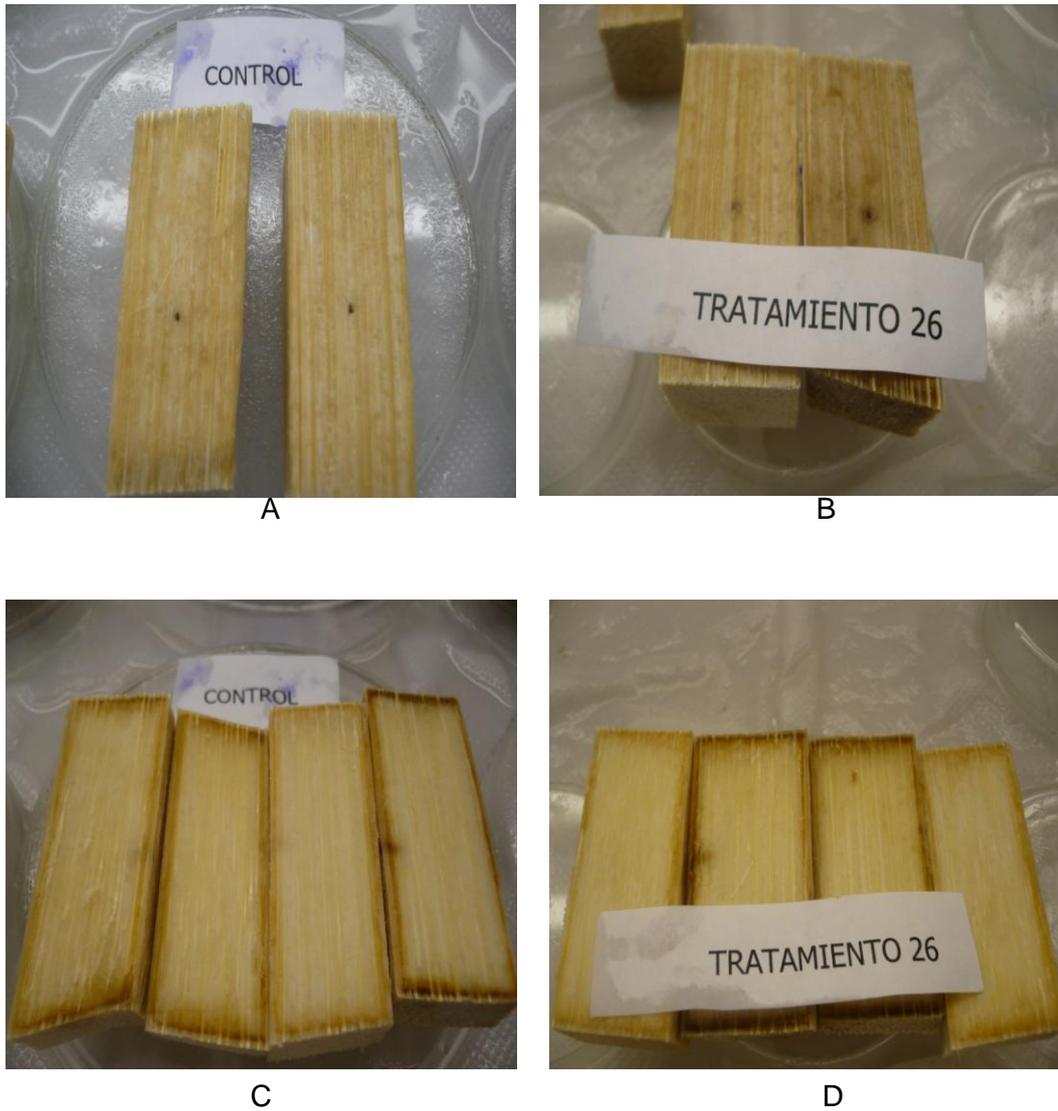


Figura 32. Trozos de raquis inoculados con bacterias aisladas de palmas afectadas por ML; A) Controles; B) Raquis inoculados con bacteria número 26; C) Disección de controles; D) Disección de raquis de tratamiento 26.

Como se observa en la figura 33, ocho aislamientos bacterianos de 28 que fueron seleccionados e inoculados en las pruebas de patogenicidad *in vitro*, causaron algún tipo de daño en el tejido. Según los resultados obtenidos las colonias bacterianas clasificadas como O, Q y V, pueden ser posibles patógenas por el comportamiento que tienen, ya que desde el primer día de inoculadas

causaron daño sobre el tejido. Igualmente en la gráfica observamos que el tratamiento Q, fue el más representativo pues causó al quinto día mayor porcentaje de daño en el tejido en comparación a los otros aislamientos que causaron algún tipo de daño.

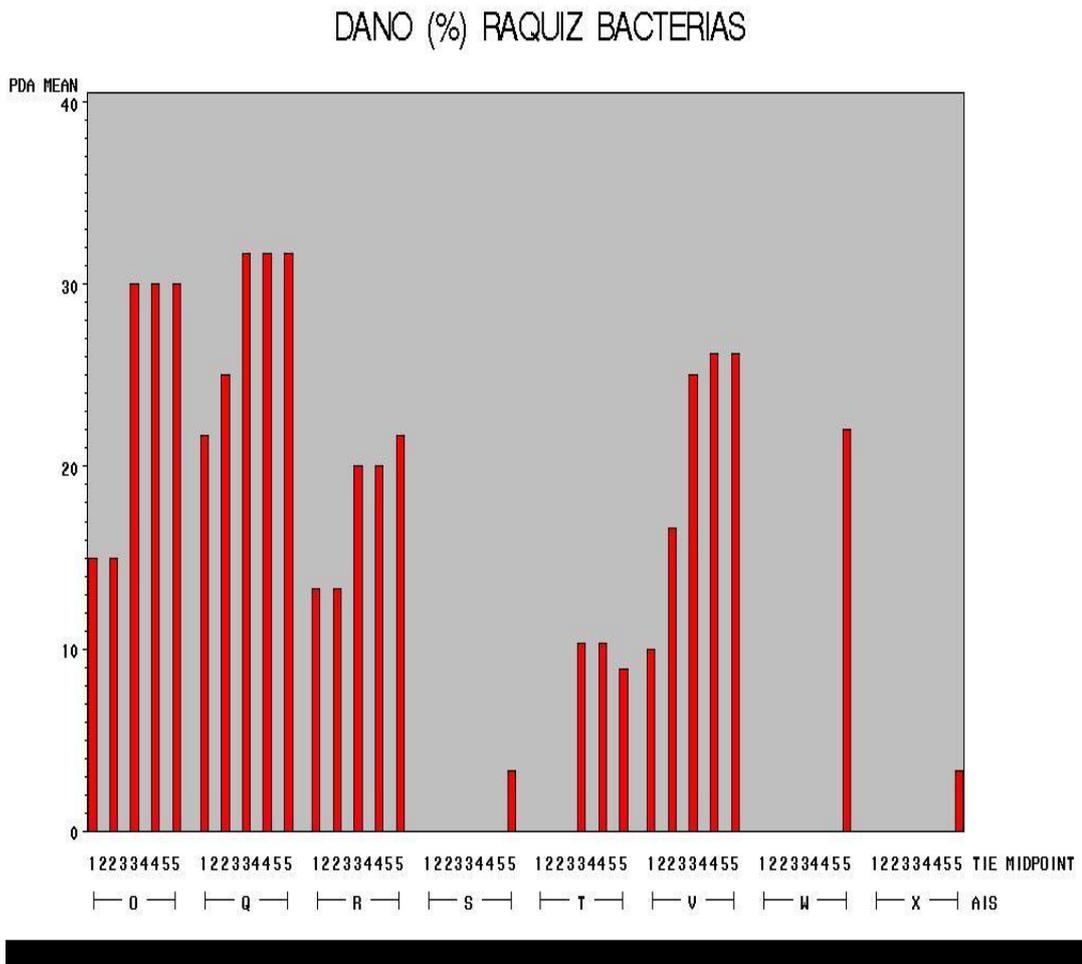


Figura 33. Porcentaje daño o necrosis de tejidos inoculado con bacterias.

Según la prueba de Tukey no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, pues ninguno causó un porcentaje de daño o necrosis (anexo11.12).

Sin embargo para la evaluación de los tratamientos durante los cinco tiempos se encontraron diferencias significativas para esto se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (anexo 10.12).

6.2.4.2 Hongos

Los trozos de raquis inoculados con los 18 hongos aislados de palmas afectadas por ML, once de ellos mostraron síntomas de necrosis o daño de tejidos. Entre estos once aislamientos, nueve de ellos se clasificaron como micelios no esporulados, seguido por una cepa de *Thielaviopsis sp*, una de *Cephalosporium sp* y una de *Fusarium sp* (Figura 34).

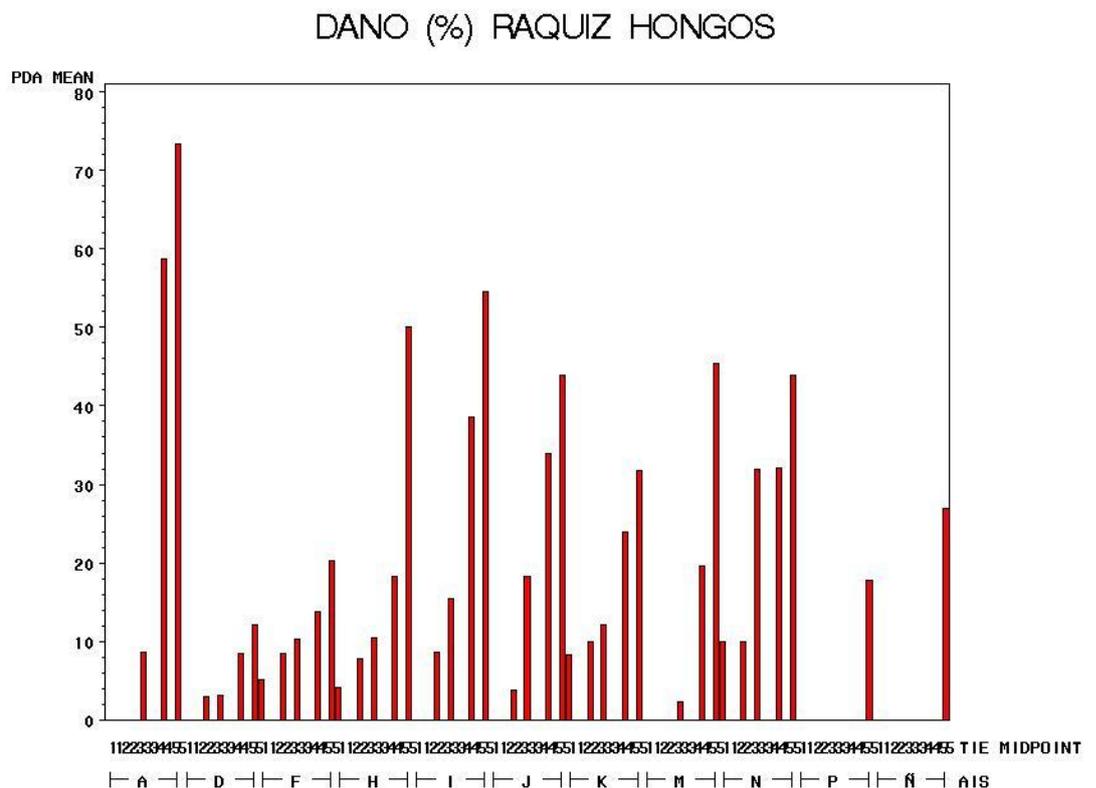
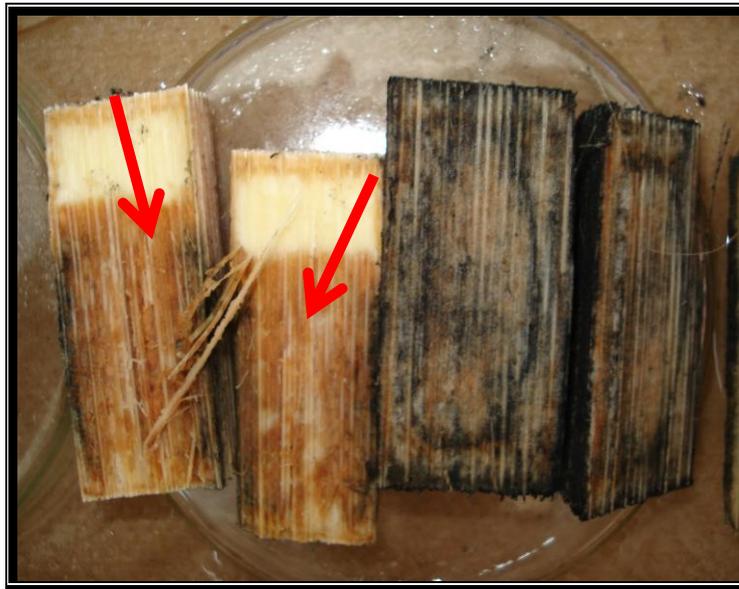


Figura 34. Porcentaje de daño en raquis causado por hongos aislados de palmas con ML.

Entre los once tratamientos que presentaron daño, el tratamiento que causó más del 50% de daño sobre el tejido fue *Thielaviopsis sp*, (Figura 35) observando, ya sea por la producción de toxinas por parte del patógeno en el tejido a causa del daño celular, (Agrios, 2005), la formación de un pigmento oscuro, débil y húmedo que se aprecia tanto en la superficie del tejido como en la parte interna (Figura 35).



A



B

Figura 35. Trozos de raquis inoculados con *Thielaviopsis* sp, afectadas por ML; A) Superficie de raquis inoculados con *Thielaviopsis*, se observa la formación de un alo ; B) Estado interno de los trozos inoculados con *Thielaviopsis*, se observa pudrición del mas del 50% de los tejidos.

Según bibliografía algunas especies de *Thielaviopsis* sp son fitopatógenas y afectan a diferentes plantas de importancia económica tales como palma datilera (*Phoenix dactylifera*), piña (*Ananas comosus*) y palmas de coco, causando necrosis de tejidos y marchitez de las hojas (Beltrán, P.1999). Esta cepa fue

almacenada para utilizarla en la siguiente fase de la investigación que consiste en inoculación en plántulas de pre-vivero.

Sin embargo realizadas las pruebas de Tukey no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos (anexo 10.13).

Para la evaluación de los cinco tiempos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis demostrando que hay diferencia significativa para los cinco tiempos por cada tratamiento (anexo 10.13).

6.2.5 Presencia y severidad de daño en plántulas de un mes

Las plántulas inoculadas con los 28 aislamientos de colonias bacterianas y los 18 aislamientos fúngicos no mostraron síntomas de daño de tejidos: clorosis, pudrición de raíces y necrosis durante los cuatro tiempos de evaluación. Tampoco se observaron coloraciones cafés en raíces que podrían evidenciar la oxidación de los tejidos. Tanto la apariencia de los folíolos como de raíz resultaron idénticas a las observadas en los controles inoculados con agua, este hecho se presentó tanto el ensayo con colonias bacterianas aisladas a partir de tejidos afectados por ML, como en el ensayo de hongos igualmente aislados de palmas afectadas por ML. No se realizó análisis estadístico a esta prueba ya que ningún tratamiento causó ningún tipo de daño en las plántulas inoculadas, clasificándose como sanas según la tabla de severidad siendo para todos los tratamientos cero (tabla 1). La severidad de una enfermedad se define como área afectada por el patógeno.

Ninguno de los 28 aislamientos de colonias bacterianas y de los 18 hongos fueron patogénicos al ser inoculados en las plántulas, ya que no causaron ningún tipo de daño durante los tiempos evaluados.

En la figura 36 se observa el estado de las plántulas que se inocularon, a las 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas de evaluación, estas no presentaron ningún síntoma de enfermedad, tanto en los tejidos internos como externos,

estas características se mantuvieron durante los 45 días siguientes a la inoculación. Como se observa en esta figura durante los cuatro tiempos inicialmente evaluados los tejidos de las plántulas tanto raíces como folíolos no presentaron ningún síntoma de daño.



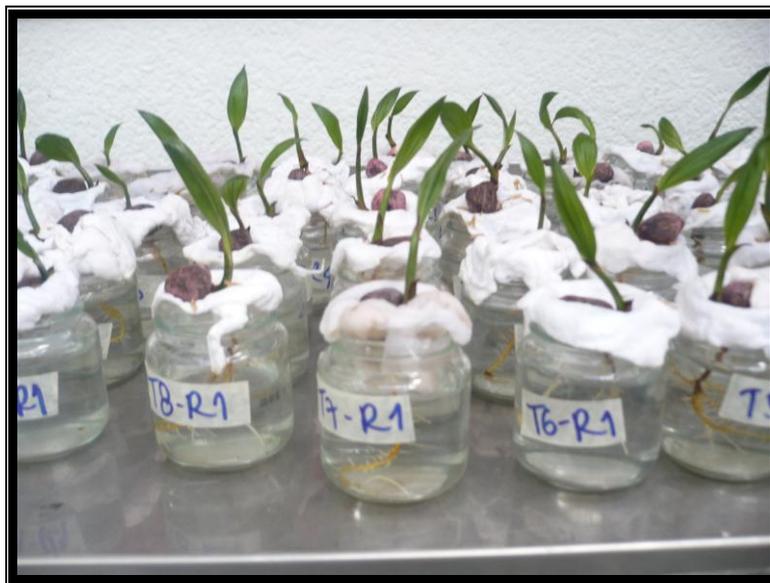
A



B



C



D

Figura 36. Evaluación de plántulas inoculadas con hongos y bacterias aislados de tejidos afectados por ML; A) Evaluación a las 24 horas; B) Evaluación a las 48 horas; C) Evaluación 72 horas; D) Evaluación a las 96 horas.

7. CONCLUSIONES

- Las únicas cepas fungosas que causaron daño o necrosis en el tejido sano de raquis fueron *Thielaviopsis sp*, *Cephalosporium sp*, *Fusarium sp* y nueve aislamientos más clasificados como micelios no esporulados.
- De las 28 colonias bacterianas los únicos aislamientos que causaron algún tipo de daño sobre raquis sano fueron los tratamientos O, Q y V, los cuales fueron clasificados como Gram negativos.
- Los análisis microbiológicos llevados a cabo sobre muestras de tejidos aislados de palmas enferma permitieron aislar bacterias Gram negativas en grandes proporciones y hongos como *Thielaviopsis sp* y *Cephalosporium sp*.
- La metodología aplicada para la selección de microorganismos a inocular fue bastante efectiva permitiendo reducir el número de posibles patógenos a ser inoculados en las pruebas *in vitro*.
- Hasta el último día de evaluación ninguno de los 18 hongos y 28 bacterias aislados fue patogénico cuando se inocularon en plántulas de un mes sanas.

8. RECOMENDACIONES

- Para confirmar o descartar que el agente causal de la Marchitez Letal sean bacterias o hongos es necesario realizar inoculaciones con los mismos microorganismos aislados para las pruebas *in vitro*, en plántulas de pre- vivero y plántulas de vivero y en campo.
- Según los resultados tres colonias bacterianas mostraron algún tipo de daño sobre el tejido de raquíz sano, es necesario realizar algunas pruebas bioquímicas para clasificar estas colonias y observar si se reportan como fitopatógenas.
- Ya que las plántulas de un mes inoculadas no mostraron ningún tipo de daño se recomiendan que se lleven a campo para observar si es posible que los microorganismos inoculados tengan un ciclo de infección largo.
- Desarrollar experimentos conducentes a disminuir la incidencia de la enfermedad mediante la aplicación de buenas prácticas de manejo agronómico.

9. BIBLIOGRAFIA

Acosta, A., Calvache, H., Hernández, M., Verdugo, J., Bedoya, R., 2001. Una marchitez vascular, nueva enfermedad de la palma de aceite. Boletín divulgativo Ceniavances 85. Cenipalma, Colombia.

Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5 edition. Elsevier Academic Press.

Airede, C. 2002. Análisis del "nuevo disturbio" de la palma de aceite presente en la Zona Oriental. Rocha, P.J. (translator). Ceniavances (Colombia) 100:1-3. ISSN: 0123-8353.

Alvañil, F. 1996. Marchitez sorpresiva y hartrot. Una revisión. Palmas (Colombia), vol. 17, no.1.

Brinkerhoff, L.A. 1970. Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its reaction to control. Annual Review of Phytopathology 8:85-110.

Barnett, O; B. Hunter.1998 Illustrated genera of imperfecti fungi. Burgess. Publishing Co. Minneapolis, USA. 218pp.

Calvache, H., Castilla, C., Sánchez, J., Tovar, J., Gutiérrez, D., Hernández, M., Verdugo, J., Ramírez, J. 2004. Avances en el estudio de la marchitez letal. Palmas (Colombia), vol. 25, no. especial. Tomo II.

Cedeño L.R., 1993^a. Rhizoctonia causante de la mancha agregada del arroz en Venezuela. Rev. For. Vene. (Resumen).

Cenipalma. 2004. Anillo Rojo-Hoja Corta. Boletín Técnico No. 9. Segunda Edición. Bogotá D.C. 31 p.

Cenipalma. 2007. Marchitez Letal. Boletín Técnico No. 1. Primera Edición. Bogotá D.C 34 p.

Cenipalma., Gobernación del Casanare,. Marchitez Letal. Fichas Técnicas No. 1. Primera Edición. Yopal, Casanare, 27p.

CIAT. 2003. Identificación de un fitoplasma asociado con la marchitez letal en palma de aceite. Informe Final entregado a plantaciones del Bajo Upía. 50p.

Corley, RHV.; Tinker, PB. 2003. The oil palm. Blackwell Publishing. 562 p.

Dhingra O, SINCLAIR J. Basic Plant Pathology Methods. CRC Lewis Publishers. Boca Raton, Florida; 1995. 6. DIOP T.

Domínguez, C, E.; Lopez A, J.; Castillo Gonzales, R.; y Ruiz B, P.1999. El Cocotero Cocus nucifera L. Manual para la Producción en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Libro Técnico Num. 6.Tabasco, México. 132 p.

Eden-Green, E. 2003. Investigación sobre las enfermedades de la palma de aceite en las Zonas Oriental y Central de Colombia. Informe sobre visita de asesoría para Cenipalma, Julio 4 al 15 de 2003.

Fedepalma. 2006. Anuario estadístico 2007. La agroindustrial de la palma de aceite en Colombia y en el mundo 2005-2006. Fedepalma. Bogotá. 121 p.

Fajardo, G., Tovar, J., Gutiérrez, G., Navia, E. 2006. Determinación de los criterios diagnósticos para la enfermedad marchitez letal de la palma de aceite. Memorias del XXVII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI. Cartagena. Colombia.

Franqueville, E. 2002. Posible Marchitez Vascular en plantaciones de Colombia. Informe de asesoría a Cenipalma.

Gómez, P. 1996 Evolución de la investigación del complejo Pudrición de Cogollo en el Centro de Investigación en Palma de Aceite –Cenipalma-. Palmas (Colombia) v 17 no.2, p .53- 56.

Gómez, P., Tovar, J., Munévar, F. 2004. Aplicación de la Agricultura de precisión en el manejo integrado de enfermedades en palma de aceite. Memorias XXV Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y ciencias Afines. Palmira, Colombia.

Grupo Upía, 2007. Informe mensual Avance Investigaciones Marchitez Letal.

Gutiérrez, D. 2007. Información personal. La pudrición bacterial de la raíz de la palma de aceite.

Hayward, A, C. 1993. Epidemiology and biology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Rev. Phytopatol. 29: 65- 87.

Klotz, L. J., and Fawcett, H. S. 1932. Black scorch of the date palm caused by *Thielaviopsis paradoxa*. J. Agric. Res. 44:155-166.

Lozano, C. 2002. la pudrición bacterial de la raíz de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*): una nueva enfermedad de la especie en Colombia. Informe de Asesoría.

Mosquera, M. 2006. Perdidas económicas por Marchitez Letal. Informe de Asesoría a Cenipalma.

Nelson *et al.* (16). Nelson, P., Toussoun, T. y Marasas, W. 1983. *Fusarium* species. An illustred Manual for identification. Universidad de Pensilvania. 40 pp.

Sánchez, N., Fuentes, F., Torres, M., Rocha, P., Calvache, H., Gómez, P. 2003. La marchitez letal no es la marchitez vascular africana causada por *Fusarium*. Palmas (Colombia), vol. 24, no. 4.

SAS, 1999. Program Statistics.

Sierra, R., González, A., Rocha, P. y Restrepo, S. 2006. *Xylella fastidiosa* no se detecta en tejidos de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq) afectada por

Marchitez Letal. Boletín divulgativo Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite Ceniavances 137. 4p. ISSN- 0123-8353.

Shurtleff, M. C. & Averre III, C. W. The plant disease clinic and field diagnosis of abiotic diseases. St. Paul, APS, 245 p.1997.

Suslow, T.; M. Schroth; M. Isaka. 1982. Application of a rapid methofor Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72:917-918.

Tovar, J. 2006. Aplicación de antibióticos como prueba de diagnóstico indirecto del agente causal de la marchitez letal de la palma de aceite. Memorias del XXVII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI. Cartagena. Colombia.

Torres, E., Tovar, J. 2004. Estudio epidemiológico de la enfermedad marchitez letal de la palma de aceite en plantaciones de Villanueva – Casanare. *Palmas (Colombia)*, vol. 25, no. especial. Tomo II.

Torres, J., Tovar, J., Gutiérrez, D., Aldana, R., Guerrero, J. 2006. Búsqueda de *Phytomonas* sp (flagelados asociados a la Marchitez sorpresiva) en palmas afectadas por marchitez Letal. *Revista palmas*, 2006.

10. ANEXOS

ANEXO II
ANEXO 10.2
DATOS PALMAS MUESTREADAS

FECHA DE RECOLECCIÓN	PLANTACIÓN	LOTE	LINEA	PALMA	Numero Consecutivo	EDAD	SÍNTOMAS
15 DE MARZO DE 2007	Casanare	G17R	29	7	Ca-00	Jóven	Enferma ML
27 DE MARZO DE 2007	Casanare	G17R	30	13	Ca-01	Jóven	Enferma ML
29 DE MARZO DE 2007	Oriente	8GR	7	1	Or-02	Jóven	Enferma ML
16 DE ABRIL DE 2007	Casanare	G17R	30	12	Ca-03	Jóven	Enferma ML
17 DE ABRIL DE 2007	Oriente	36R	259	3	Or-04	Jóven	Enferma ML
03 DE MAYO DE 2007	Guaicaramo	B238	147	8	Ga-05	Jóven	Sana
07 DE MAYO DE 2007	Casanare	G17R	37	10	Ca-06	Jóven	Enferma ML
26 DE MAYO DE 2007	Casanare	G17R	30	8	Ca-07	Jóven	Enferma ML
31 DE MAYO DE 2007	Guaicaramo	326 P.6	175	7	Ga-08	Jóven	Sana
04 DE JUNIO DE 2007	Santana	51A	34	15	Sa-09	Jóven	Enferma ML
04 DE JUNIO DE 2007	Santana	52A	32	6	Sa-10	Jóven	Enferma ML
05 DE JUNIO DE 2007	Casanare	23A	101	4	Ca-11	Jóven	Enferma ML
21 DE JUNIO DE 2007	Guaicaramo	B23- P 11	11	4	Ga-12	Jóven	Sana
21 DE JUNIO DE 2007	Guaicaramo	B23- P 11	15	6	Ga-13	Jóven	Sana
21 DE JUNIO DE 2007	Guaicaramo	B22-P 11	20	8	Ga-14	Jóven	Sana
11 DE JULIO DE 2007	Upía	13	21	5	Up-15	Jóven	Enferma ML
11 DE JULIO DE 2007	Upía	13	22	6	Up-16	Jóven	Enferma ML
11 DE JULIO DE 2007	Upía	13	26	11	Up-17	Jóven	Enferma ML
24 DE JULIO DE 2007	Upía	13	23	6	Up-18	Jóven	Enferma ML
24 DE JULIO DE 2007	Upía	13	22	13	Up-19	Jóven	Enferma ML
24 DE JULIO DE 2007	Upía	13	21	12	Up-20	Jóven	Enferma ML
16 DE AGOSTO DE 2007	Casanare	G17R	30	22	Ca-21	Jóven	Enferma ML

**ANEXO VIII
ANEXO 10.8**

PRUEBA DE PATOGENICIDAD *in vitro* EN TEJIDOS CON BACTERIAS

PERIODO DE INCUBACION EN RAQUIZ Y RAIZ

ANALISIS DE SOBREVIVENCIA

BACTERIAS RAIZ

Summary Statistics for Time Variable DIA

Quartile Estimates			
Percent	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower Upper)	
75	.	3.00000	.
50	2.00000	.	.
25	1.00000	1.00000	2.00000

Mean	Standard Error
2.10119	0.06527

BACTERIAS RAQUIS

1998 573

BACTERIAS TEJIDOS 15:53 Tuesday, November 17,

The LIFETEST Procedure

Stratum 2: TE = RAQU

Product-Limit Survival Estimates

DIA	Survival	Failure	Survival Standard Error	Number Failed	Number Left
5.00000*	.	.	.	85	4
5.00000*	.	.	.	85	3
5.00000*	.	.	.	85	2
5.00000*	.	.	.	85	1
5.00000*	.	.	.	85	0

NOTE: The marked survival times are censored observations.

Summary Statistics for Time Variable DIA

Quartile Estimates			
Percent	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower Upper)	
75	.	.	.
50	3.00000	2.00000	.
25	1.00000	1.00000	2.00000

Mean	Standard Error

2.23810

0.06995

1998 574

BACTERIAS TEJIDOS 15:53 Tuesday, November 17,

The LIFETEST Procedure

Testing Homogeneity of Survival Curves for DIA over Strata

Rank Statistics

TE	Log-Rank	Wilcoxon
RAIZ	23.091	4506.0
RAQU	-23.091	-4506.0

Covariance Matrix for the Log-Rank Statistics

TE	RAIZ	RAQU
RAIZ	37.2746	-37.2746
RAQU	-37.2746	37.2746

Covariance Matrix for the Wilcoxon Statistics

TE	RAIZ	RAQU
RAIZ	2876165	-2876165
RAQU	-2876165	2876165

Test of Equality over Strata

Test	Chi-Square	DF	Pr > Chi-Square
Log-Rank	14.3050	1	0.0002
Wilcoxon	7.0594	1	0.0079
-2Log(LR)	19.2876	1	<.0001

**ANEXO IX
ANEXO 10.9**

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD in vitro EN TEJIDOS CON HONGOS

PERIODO DE INCUBACION EN RAQUIZ Y RAIZ

ANALISIS DE SOBREVIVENCIA

HONGOS RAIZ

PRUEBAS HONGOS TEJIDOS 505
November 17, 1998 15:53 Tuesday,

Quartile Estimates

The LIFETEST Procedure

Summary Statistics for Time Variable DIA

Quartile Estimates

Percent	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower Upper)	
75	3.50000	3.00000	4.00000
50	2.00000	1.00000	3.00000
25	1.00000	.	.

Mean	Standard Error
2.29630	0.12360

HONGOS RAQUIS

PRUEBAS HONGOS TEJIDOS 509
November 17, 1998 15:53 Tuesday,

The LIFETEST Procedure

Summary Statistics for Time Variable DIA

Quartile Estimates

Percent	Point Estimate	95% Confidence Interval [Lower Upper)	
75	5.00000	4.00000	.
50	3.00000	2.00000	4.00000
25	2.00000	1.00000	2.00000

Mean	Standard Error
------	----------------

3.11111

0.14802

Test of Equality over Strata

Test	Chi-Square	DF	Pr > Chi-Square
Log-Rank	21.6465	1	<.0001
Wilcoxon	16.5222	1	<.0001
-2Log(LR)	11.5945	1	0.0007

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr
> F					
AIS	17	333.7037037	19.6296296	26.84	<.0001
TEJ	1	44.4629630	44.4629630	60.78	<.0001
AIS*TEJ	17	83.7037037	4.9237473	6.73	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	17	333.7037037	19.6296296	26.84	<.0001
TEJ	1	44.4629630	44.4629630	60.78	<.0001
AIS*TEJ	17	83.7037037	4.9237473	6.73	<.0001

**ANEXO X
ANEXO 10.10**

PORCENTAJE DAÑO O NECROSIS DE TEJIDO

RAIZ BACTERIAS

DANO(%) RAIZ BACTERIAS 9 18:32

Tuesday, November 17, 1998

R-Square	Coeff Var	Root MSE	RPDA Mean
0.039844	48.55026	7.525291	15.50000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
AIS	4	58.75000000	14.68750000	0.26

Pr > F 0.9012

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
AIS	4	58.75000000	14.68750000	0.26

Pr > F 0.9012

DANO(%) RAIZ BACTERIAS 10 18:32

Tuesday, November 17, 1995

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

Alpha	0.1
Error Degrees of Freedom	25
Error Mean Square	56.63
Critical Value of Studentized Range	3.68300
Minimum Significant Difference	11.315

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	17.167	6	M
A	16.000	6	H
A	15.750	6	L
A	15.667	6	K
A	12.917	6	Q

**ANEXO XI
ANEXO 10.11**

PORCENTAJE DAÑO O NECROSIS DE TEJIDO

RAIZ HONGOS

Porcentaje daño de tejido

Kruskal wallis no paramétrica para diseños completamente al azar

% DAÑO DE TEJIDO

DANO(%) RAIZ HONGOS

6

18:32 Tuesday, November

17, 1998

The GLM Procedure

Dependent Variable: RPDA Rank for Variable PDA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	168.416667	42.104167	0.70	0.5986
Error	25	1501.583333	60.063333		
Corrected Total	29	1670.000000			

R-Square Coeff Var Root MSE RPDA Mean
0.100848 50.00035 7.750054 15.50000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	4	168.416667	42.1041667	0.70	0.5986

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	4	168.416667	42.1041667	0.70	0.5986

PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS NO PARAMETRICA PARA DCA

**ANEXO XII
ANEXO 10.12**

PORCENTAJE DAÑO O NECROSIS DE TEJIDO

RAQUIS BACTERIAS

R-Square Coeff Var Root MSE RPDA Mean
 0.843499 22.33972 5.473230 24.50000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
AIS	7	6458.250000	922.607143	30.80

Pr > F <.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
AIS	7	6458.250000	922.607143	30.80

Pr > F <.0001

R-Square Coeff Var Root MSE RPDA Mean
 DANO(%) RAQUIZ BACTERIAS 88
 18:32 Tuesday,
 November 17, 1998

----- TIE=1 -----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	29.95625
Critical Value of Studentized Range	4.52055
Minimum Significant Difference	10.101

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	37.750	6	O
A	37.750	6	Q
A	36.000	6	R

A				
A	32.500	6	V	
B	13.000	6	T	
B	13.000	6	S	
B	13.000	6	W	
B	13.000	6	X	

DANO(%) RAQUIZ BACTERIAS

90

18:32 Tuesday,

November 17, 1998

----- TIE=2 -----

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
AIS	7	6399.333333	914.190476	27.13

Pr > F <.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
AIS	7	6399.333333	914.190476	27.13

Pr > F <.0001

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	33.69167
Critical Value of Studentized Range	4.52055
Minimum Significant Difference	10.712

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	37.500	6	Q
A	37.167	6	V
A	35.500	6	O
A	33.833	6	R
B	13.000	6	T
B	13.000	6	S

B
B 13.000 6 W
B
B 13.000 6 X
93

DANO(%) RAQUIZ BACTERIAS

18:32 Tuesday,
November 17, 1998

----- TIE=3 -----

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
AIS	7	7632.250000	1090.321429	53.83

Pr > F <.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
AIS	7	7632.250000	1090.321429	53.83

Pr > F <.0001

11.13

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	20.25625
Critical Value of Studentized Range	4.52055
Minimum Significant Difference	8.3061

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	38.917	6	Q
A	38.667	6	O
A	35.250	6	V
A	32.667	6	R
B	22.000	6	T

C	9.500	6	S
C			
C	9.500	6	W
C			
C	9.500	6	X

DANO(%) RAQUIZ BACTERIAS

96

18:32 Tuesday,

November 17, 1998

----- TIE=4 -----

R-Square	Coeff Var	Root MSE	RPDA Mean
0.893712	19.44406	4.763796	24.50000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
AIS	7	7632.750000	1090.392857	48.05

Pr > F <.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
AIS	7	7632.750000	1090.392857	48.05

Pr > F <.0001

DANO(%) RAQUIZ BACTERIAS

97

18:32 Tuesday,

November 17, 1998

----- TIE=4 -----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	22.69375
Critical Value of Studentized Range	4.52055
Minimum Significant Difference	8.7916

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	38.417	6	Q
A			
A	38.167	6	O

A			
A	36.917	6	V
A			
A	32.000	6	R
B	22.000	6	T
C	9.500	6	S
C			
C	9.500	6	W
C			
C	9.500	6	X

DANO(%) RAQUIZ BACTERIAS

99

18:32 Tuesday,

November 17, 1998

----- TIE=5 -----

The GLM Procedure

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
AIS	7	5103.069048	729.009864	8.02

Pr > F
 <.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
AIS	7	5103.069048	729.009864	8.02

Pr > F
 <.0001

DANO(%) RAQUIZ BACTERIAS

100

18:32 Tuesday,

November 17, 1998

----- TIE=5 -----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	40
Error Mean Square	90.89827
Critical Value of Studentized Range	4.52055
Minimum Significant Difference	17.658
Harmonic Mean of Cell Sizes	5.957447

NOTE: Cell sizes are not equal.

ANEXO 10.13 PORCENTAJE DAÑO O NECROSIS DE TEJIDO

RAQUIS HONGOS A LOS CINCO TIEMPOS

DANO(%) RAQUIZ HONGOS
17, 1998

252

18:32 Tuesday, November

----- TIE=1 -----

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	12972.58333	1297.25833	26.19	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	12972.58333	1297.25833	26.19	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	55
Error Mean Square	49.52576
Critical Value of Studentized Range	4.74830
Minimum Significant Difference	13.642

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	60.500	6	N
A			
A	54.333	6	K
A			
B	49.750	6	F
B			
B	39.417	6	H
C	23.500	6	D
C			
C	23.500	6	J
C			
C	23.500	6	I
C			
C	23.500	6	M
C			
C	23.500	6	A
C			
C	23.500	6	P
C			
C	23.500	6	Ñ

DANO(%) RAQUIZ HONGOS
17, 1998

255

18:32 Tuesday, November

----- TIE=2 -----

 R-Square Coeff Var Root MSE RPDA Mean
 0.664470 33.18795 11.11796 33.50000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	13463.50000	1346.35000	10.89	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	13463.50000	1346.35000	10.89	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	55
Error Mean Square	123.6091
Critical Value of Studentized Range	4.74830
Minimum Significant Difference	21.552

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS		
A	51.250	6	K		
A					
A	51.000	6	N		
A					
A	48.500	6	F		
A					
A	47.333	6	I		
A					
B	A	44.083	6	H	
B	A				
B	A	C	30.750	6	D
B		C			
B		C	25.583	6	J
		C			
		C	17.500	6	M
		C			
		C	17.500	6	A
		C			
		C	17.500	6	P
		C			
		C	17.500	6	N

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	12064.41667	1206.44167	6.27	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	12064.41667	1206.44167	6.27	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	55
Error Mean Square	192.3379
Critical Value of Studentized Range	4.74830
Minimum Significant Difference	26.884

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	52.000	6	N
B A	46.250	6	K
B A	46.167	6	I
B A	41.667	6	H
B A C	40.333	6	F
B A C	37.500	6	J
B D A C	37.500	6	A
B D C	23.000	6	D
D C	19.083	6	M
D	12.500	6	P
D	12.500	6	Ñ

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	12497.16667	1249.71667	6.30	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	12497.16667	1249.71667	6.30	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for RPDA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate but generally has a higher type

II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	55
Error Mean Square	198.4606
Critical Value of Studentized Range	4.74830
Minimum Significant Difference	27.309

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	50.083	6	I
A			
A	49.083	6	A
A			
A	45.250	6	J
A			
A	42.250	6	K
A			
A	40.750	6	N
A			
A	37.750	6	H
A			
B	31.000	6	F
B			
B	30.417	6	M
B			
B	22.917	6	D
B			
B	9.500	6	P
B			
B	9.500	6	Ñ

DANO(%) RAQUIZ HONGOS

17, 1998

18:32 Tuesday, November

TIE=5

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	10103.91667	1010.39167	4.03	0.0004

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIS	10	10103.91667	1010.39167	4.03	0.0004

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	AIS
A	50.167	6	I
A			
A	49.250	6	A
A			
B A	43.083	6	J
B A			
B A C	41.333	6	M
B A C			
B A C	38.583	6	H
B A C			
B A C	37.750	6	N
B A C			
B A C	31.583	6	K
B A C			
B A C	27.750	6	Ñ
B A C			
B A C	20.000	6	F
B C			
B C	17.667	6	P
C			
C	11.333	6	D