

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE *ELAEIS GUINEENSIS* JACQ A  
*PHYTOPHTHORA PALMIVORA* POR MÉTODOS MICROSCÓPICOS Y  
BIOQUÍMICOS.**

**GILBERTO PICO ORTIZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2015**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE *ELAEIS GUINEENSIS* JACQ A  
*PHYTOPHTHORA PALMIVORA* POR MÉTODOS MICROSCÓPICOS Y  
BIOQUÍMICOS.**

**GILBERTO PICO ORTIZ**

**Trabajo de grado para optar al título de biólogo**

**Directora:**

**CARMENZA MONTOYA JARAMILLO**

**Doctora en Ciencias-Biología**

**CENIPALMA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**BUCARAMANGA**

**2015**

## **DEDICADO A:**

Al Todopoderoso por haberme permitido culminar con éxito mi trabajo de grado y mi carrera.

A mis padres Gilberto y Gladys por su inmenso apoyo y comprensión durante el tiempo de estudio universitario.

A mis hermanas Diana Isabel y Angie Juliana.

A mi tía Mercedes Pico por su apoyo sobre todo en el tiempo de llegada a Bucaramanga y al inicio de mi carrera.

A Angélica Vásquez y Dayana Guevara por hacer mis días estadía en Barrancabermeja y de trabajo en La Vizcaína más alegres y llevaderos.

A Claudia, Viviana y Angie, las guardianas de mis semestres académicos.

A todos y todas las personas que laboran en el programa de Biología y Mejoramiento de CENIPALMA.

A todas aquellas personas que conocí en Barrancabermeja y que compartí durante mi tiempo de trabajo en La Vizcaína.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología-**COLCIENCIAS**

A la Federación de Cultivadores de Palma de Aceite-**FEDEPALMA**

A la Corporación Centro de Investigación Para La Palma de Aceite-**CENIPALMA**

Al Dr. Jens Mesa Dishington. Director ejecutivo. **FEDEPALMA**

Al Dr. José Ignacio Sanz Scovino. Director general. **CENIPALMA**

Al Dr. Hernan Mauricio Romero Angulo. Coordinador del programa de biología y mejoramiento de la palma de aceite.

A la Dra. Carmenza Montoya Jaramillo. Investigadora Titular. Laboratorio de Biología Molecular.

A la MSc. Kelly Johana Ávila Mendez. Estudiante de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia.

A Dayanna Julieth Gevara Mejía. Auxiliar de laboratorio. Biología Molecular Cenípalma

Y en general a todas las personas que laboran en el Laboratorio de Biología Molecular de Cenípalma y en el Centro Experimental Palmar de la Vizcaína.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
1.3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.	18
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1. DESCRIPCIÓN DE LA PALMA DE ACEITE	20
2.2. ORIGEN Y GENERALIDADES DE LA INDUSTRIA DE LA PALMA DE ACEITE.	24
2.3. PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA	27
2.3.1. La pudrición de cogollo (PC)	29
2.4. CARACTERÍSTICAS Y BIOLOGÍA DE <i>PHYTHOPHTORA PALMIVORA</i> .	32
2.5. SISTEMA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS.	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. MATERIAL VEGETAL	37
3.2. MATERIAL DE INOCULACIÓN	38
3.3. ACTIVACIÓN DEL PATÓGENO	38
3.4. PROCESO DE INFECCIÓN DE TEJIDOS	40
3.5. DETECCIÓN MICROSCÓPICA DE ESTRUCTURAS DE <i>P. PALMIVORA</i> EN TEJIDOS DE PALMA DE ACEITE, MEDIANTE TINCIÓN HISTOLÓGICA.	41
3.6. DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO MEDIANTE PRUEBA DAB (3,3'-DIAMINOBENZIDINA).	42

3.6.1. Procedimiento de inoculación de tejidos de palma	42
3.6.2. Preparación del reactivo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (1mg/ml)	42
3.6.3. Reacción de los tejidos en la prueba DAB	43
3.7. DETECCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO ( $O_2^-$ ) MEDIANTE NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT).	43
3.7.1. Preparación del reactivo Nitroblue Tetrazolium	43
3.7.2. Preparación de las soluciones auxiliares	44
3.7.3. Preparación de la solución de Nitroblue Tetrazolium	44
3.7.4. Reacción de los tejidos en la prueba con Nitroblue Tetrazolium	44
3.8. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	45
3.8.1. Determinación de proteínas	45
3.8.1.1. Diseño de la curva de calibración	45
3.8.1.2. Preparación de las muestras	46
3.8.1.3. Procesamiento de las muestras	46
3.8.2. Determinación de la actividad enzimática catalasa	46
3.8.2.1. Determinación del peróxido remanente	47
3.8.2.2. Determinación de peróxido disponible	47
3.8.3. Determinación de la actividad enzimática peróxidasa.	48
3.8.3.1. Procesamiento de las muestras	48
3.8.4. Determinación de la actividad enzimática peroxidasa.	48
3.8.5. Determinación de la actividad enzimática de la fenilamonio-liasa (PAL).	49
3.9. PRUEBAS ESTADÍSTICAS	49
4. RESULTADOS	50
4.1. ESTRUCTURAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN DE <i>PHYTOPHTHORA PALMIVORA</i> EN TEJIDOS DE PALMA INOCULADOS	50
4.2. CONTEO DE ESTRUCTURAS POR ORTET	59
4.3. DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO MEDIANTE PRUEBA DAB.	62

4.4. DETECCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO MEDIANTE NITROBLUE TETRAZOLIUM.	64
4.5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	65
4.5.1. Catalasa	65
4.5.2. Peroxidasa	67
4.5.3. Fenilamonió-Liasa (PAL)	68
5. DISCUSIÓN	70
5.1. OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS Y CONTEO DE ESTRUCTURAS	70
5.2. PRUEBA DAB Y NBT	73
5.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	74
5.3.1. Catalasa	74
5.3.2. Peroxidasa	75
5.3.3. Fenilamonió-Liasa (PAL)	75
6. CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	79

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Distribución natural de las poblaciones naturales de <i>E. guineensis</i> y <i>E. oleifera</i> .	21
Figura 2. Palma africana <i>E. guineensis</i> . Aparece con racimo, fruto e inflorescencias masculinas y femeninas.	22
Figura 3. (A) Inflorescencia masculina. (B) Inflorescencia femenina de la palma de aceite.	23
Figura 4. Morfología del fruto de palma. Clasificados según el grosor de cuesco	24
Figura 5. Zonas palmeras de Colombia.	27
Figura 6. Cultivo de palma afectado por la PC en Puerto Wilches, Santander.	30
Figura 7. Ciclo de infección del género <i>Phytophthora</i> .	33
Figura 8. Proceso de invasión a la planta de un oomiceto hemibiótrofo. (Yang, et al., 2014). GT-Tubo germinativo. S-Espora. SL-Apresorio. HL-Túbulo germinativo.	34
Figura 9. Pera inoculada con <i>Phytophthora palmivora</i> en cámara húmeda.	39
Figura 10. Ortet 34; zoosporas enquistadas 2 horas después de la inoculación.	51
Figura 11. Ortet 57; 2 horas después de la inoculación. Zoospora penetrando un estoma. E: Estoma. Z: Zoospora.	51
Figura 12. Ortet 34; 4 horas después de la inoculación. Zoospora con protoapresorio sobre una nervadura. Z: Zoospora. Tg: Túbulo germinativo.	52
Figura 13. Ortet 57. Transcurridas 4 horas después de la inoculación. Se aprecia una zoospora (Z) con protoapresorio (Pa) sobre un estoma (E).	53
Figura 14. Ortet 34 luego de transcurridas 6 horas de la inoculación. Se evidencia un apresorio bien formado.	54
Figura 15. Ortet 57 después de 6 horas de inoculación. Se evidencian zoosporas (Z) con un apresorio (A) bien formado y bien desarrollado.	54

Figura 16. Ortet 34. 12 horas luego de la inoculación. Se observa una estructura perteneciente a la zoospora (Z) invasiva y transparente. También se puede apreciar una pequeña hifa miceliar (H) de color azul, brotando del estoma (E) invadido.	55
Figura 17. Ortet 57. 12 horas luego de la inoculación. Se observa una hifa (H) miceliar de color azul, brotando de los estomas (E) invadidos.	56
Figura 18. Ortet 34. 24 horas después de la inoculación. Se aprecian estomas (E) invadidos y con hifas (H) miceliar brotando de dicha estructura.	57
Figura 19. Ortet 57. 24 horas después de la inoculación. Se puede observar un estoma fuertemente teñido de azul debido al estado avanzado de la hifa miceliar que además se puede apreciar mucho mas larga que en el ortet 34.	57
Figura 20. Ortet 34. 48 horas después de la inoculación. Se observa un estoma invadido con hifa miceliar saliendo del mismo y con coloración azul en una parte además de transparente en la parte mas alargada.	58
Figura 21. Ortet 57. 48 horas después de la inoculación. Se puede observar tenuemente un estoma (E) y micelio (M) saliendo del mismo. También se puede apreciar esporangios (Es) en maduración al final de las hebras de micelio.	59
Figura 22. Conteo de quistes para el Ortet 34 (arriba) y para el Ortet 57 (abajo). HPI: Horas Posteriores a la Inoculación	60
Figura 23. Conteo de apresorios para el Ortet 34 (arriba) y para el Ortet 57 (abajo). HPI: Horas Posteriores a la Inoculación.	61
Figura 24. Conteo de haustorios en el Ortet 34 (arriba) y en el Ortet 57 (abajo).	62
Figura 25. Ortet 34. Prueba DAB. Discos teñidos para los seis (6) tiempos evaluados con sus respectivos controles.	63
Figura 26. Ortet 57. Prueba DAB. Discos teñidos para los seis (6) tiempos evaluados con sus respectivos controles.	63
Figura 27. Ortet 34. Prueba NBT. Discos inoculados y teñidos para los tres tiempos evaluados para la presente prueba y con respectivo control.	64

Figura 28. Ortet 57. Discos inoculados y teñidos para los tres tiempos evaluados para la presente prueba y con respectivo control.	65
Figura 29. Comportamiento de la actividad de la enzima caltalasa en los dos Ortets evaluados.	66
Figura 30. Comportamiento de la actividad enzimática peroxidasa en los Ortets evaluados.	68
Figura 31. Comportamiento de la actividad enzimática Fenilamonio-Liasa (PAL) en los tiempos evaluados.	69

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1 Cantidades necesarias para la curva de calibración con BSA.	45

## RESUMEN

**TITULO:** Caracterización de la respuesta de *Elaeis guineensis* Jacq a *Phytophthora palmivora* por métodos microscópicos y bioquímicos\*.

**AUTOR:** Gilberto Pico Ortiz\*\*

**PALABRAS CLAVES:** *Elaeis guineensis*, Pudrición de Cogollo, *Phytophthora palmivora*, Infección, Microscopía, Pruebas Histológicas, Pruebas Bioquímicas.

### DESCRIPCIÓN

La palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq) es el cultivo oleaginoso más productivo por hectárea del mundo. Colombia es el cuarto productor mundial de aceite de palma. Para la Zona Central palmera el principal reto es la enfermedad pudrición de cogollo (PC), la cual devastó la mayoría de los cultivos en Puerto Wilches (Santander). Una opción de manejo es la remoción del tejido infectado, método costoso o el cultivo del híbrido OxG, con la consecuente reducción en la tasa de extracción de aceite. Por lo anterior, las investigaciones se dirigen a evaluar la resistencia de la palma de aceite al microorganismo iniciador del complejo PC, el oomiceto *Phytophthora palmivora*. Con el objetivo de caracterizar la respuesta de *E. guineensis* Jacq al proceso de infección de *P. palmivora*, se utilizaron clones in vitro. Se evaluaron dos grupos clonales u Ortets y se hizo seguimiento microscópico durante 6 tiempos de infección, mediante tinción con azul de tripano. Se les hizo seguimiento histoquímico para detectar especies reactivas de oxígeno por medio de la tinción DAB y NBT. Para detectar la respuesta bioquímica de los clones, se cuantificó la actividad enzimática de la catalasa (CAT), peroxidasa (POD), y fenilamonio-liasa (PAL). Se detectaron diferencias en el desarrollo de la infección en el Ortet resistente (34) frente al Ortet susceptible (57), ya que las diferentes estructuras de ataque se desarrollan a tiempos diferentes. Además en las pruebas histoquímicas se detectó mayor reacción en las dos pruebas evaluadas en el Ortet resistente (34). En las pruebas bioquímicas se detectó una actividad enzimática variable entre los dos Ortets evaluados. Los hallazgos en este estudio indican que el Ortet 34 exhibe algún grado de resistencia al ataque de *P. palmivora*.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Directora: Carmenza Montoya Jaramillo.

## ABSTRACT

**TITLE:** Characterization of the response of *Elaeis guineensis* Jacq to *Phytophthora palmivora* by microscopic and biochemical methods\*.

**AUTOR:** Gilberto Pico Ortiz\*\*

**Key words:** *Elaeis guineensis*, Bud Rot, *Phytophthora palmivora*, Infection, Microscopy, Histochemical tests, Biochemical tests.

### DESCRIPTION:

The oil palm (*Elaeis guineensis* jacq) is the most productive oleaginous crop by hectare in the world. Colombia is the fourth oil palm world producer. In the Central palm Zone, the most important challenge is the bud rot disease, which had devastate the majority of crops in Puerto Wilches (Santander). One option is to remove the infected tissue, expensive method, or cultivation OxG hybrid with a consequent reduction in the rate of oil extraction. Therefore, investigations are directed to evaluate the resistance of oil palm to the initiator microorganism of bud rot complex, the oomycete *Phytophthora palmivora*. With the objective of characterize the response of *E. guineensis* to the process of infection by *P. palmivora*, in vitro clones were used. Two clonal groups or Ortet were evaluated. The microscopical following was made for 6 infection times, using tripane blue staining. A histochemical follow up was made to detect oxygen reactive species, using the staining methods of DAB and NBT. To detect the biochemical response of the clones, the enzymatic activity of the catalasa (CAT), peroxidases (POD) and Phenylamoniie-liase (PAL) were measured. Differences were detected in the infection development in resistant Ortet 34 in comparison with the susceptible Ortet 57, because of differential development time of the attack structures. Also, in the histochemical test was detected a greater reaction in the two test made in the resistant Ortet 34. In the biochemical test, was detected a variable enzymatic activity between the two Ortets tested. The findings in this study indicate that Ortet 34 exhibits some degree of resistance to attack by *P. palmivora*.

---

\* Work degree

\*\* Faculty of Sciences, School of Biology, Director: Carmenza Montoya Jaramillo

## INTRODUCCIÓN

La industria de la palmicultura colombiana se sustenta en la siembra de la especie *Elaeis guineensis* Jacq, la cual está siendo afectada de manera importante por la pudrición de cogollo (PC). La pudrición del cogollo es una devastadora enfermedad que afecta a la palma de aceite ya que empieza con una pudrición de la hoja flecha y lleva a la muerte de la palma si alcanza los tejidos meristemáticos (de Franqueville 2003). Según una descripción más detallada, presentada por Martínez (2009) los síntomas iniciales se aprecian en la hoja flecha y el proceso de pudrición tiene lugar en los tejidos inmaduros en proceso de crecimiento en la zona del cogollo de la palma enferma. En palmas adultas afectadas, se observan todas las hojas nuevas completamente secas y los cortes longitudinales revelan el cogollo con una pudrición de color rojizo y olor desagradable. En la fase terminal se evidencia el ataque al meristemo y la muerte del mismo, conllevando a la pérdida definitiva de la planta (Martínez et al. 2013).

Se sabe que en la zona de Tumaco donde la PC se conoce desde la década de los 70, la enfermedad se mantuvo por más de 30 años con una incidencia por debajo del 1%, con un manejo agronómico enfocado en la erradicación temprana de palmas afectadas, más aplicaciones de fungicidas e insecticidas (de Franqueville 2003). Pero entre el 2005 y 2006 la PC adquiere características epidémicas en la zona (Sarria et al. 2008a).

Como la enfermedad en campo se caracteriza por ser un complejo de microorganismos que en su totalidad ocasionan la Pudrición del Cogollo (PC) (Sarria et al. 2008a), durante veinte años se realizaron diferentes esfuerzos para identificar los patógenos asociados a esta enfermedad. Las investigaciones desarrolladas condujeron a la identificación de una serie de patógenos que

generaban algún daño en las flechas de palma, entre estos cabe mencionar *Thielaviopsis ssp* , *Paradoxa ssp*, y *Fusarium solani* (Martínez 2009). Se creyó que el daño inicial se daba por un ataque en conjunto de dichos microorganismos, ya que todos estos se lograron aislar de una herida en flechas de *Elaeis* (Sarria et al. 2008a). Posteriormente la atención se dirigió hacia *Thielaviopsis ssp*; pero en el 2008 luego de dirigir una serie de investigaciones, Cenipalma logró identificar a *Phytophthora palmivora* como el agente iniciador de la enfermedad de la pudrición del cogollo (Sarria et al. 2008b).

Aspectos tales como la dispersión de *P. palmivora* , etapas de infección y los factores que propician el ataque hacia la hoja flecha de la palma han sido blanco de estudio (Martínez et al. 2013). Simultáneamente, se vienen realizando investigaciones acerca de la biología del patógeno, ya que poco se conoce sobre el ciclo de vida de dicho organismo en la palma de aceite (Martínez et al. 2010).

El estudio de la enfermedad ha avanzado mucho en cuanto a la descripción macroscópica consignada en una escala de severidad. En el 2008 se presenta por primera vez una escala del avance de la infección en la hoja flecha, con el propósito de implementar estrategias de diagnóstico temprano para el adecuado manejo y control de la enfermedad en plantaciones (Martínez 2008). Sin embargo la observación microscópica no se ha descrito en detalle. El entendimiento del avance del patógeno es uno de los campos importantes para dilucidar el desarrollo de la enfermedad y así explicar el cómo de los mecanismos de resistencia en palmas tolerantes.

Por las anteriores razones, es necesario entender cómo *P. palmivora* se asocia a su hospedero y la caracterización de la respuesta en diferentes materiales a la invasión. Cabe preguntarse ¿Cuáles son las principales características en el proceso de infección causado por *P. palmivora* en *E. guineensis*?

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta de *Elaeis guineensis* Jacq utilizando clones *in vitro* al proceso de infección de *Phytophthora palmivora*, por métodos microscópicos y bioquímicos.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer los aislamientos de *P. palmivora* en las condiciones de patogenicidad adecuadas para el desarrollo del proceso de infección.
- Desarrollar un protocolo de inoculación e infección de *P. palmivora* en clones *in vitro* de *E. guineensis*.
- Determinar cuáles son las mejores técnicas histológicas para el seguimiento en laboratorio de la lesión causada por *P. palmivora* en hojas de *E. guineensis*.
- Describir las etapas del proceso de infección causado por *P. palmivora* en *E. guineensis* a nivel morfológico.
- Evaluar mediante pruebas bioquímicas la respuesta de *E. guineensis* frente al proceso de infección de *P. palmivora*.

### 1.3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.

Existen diferencias en el procesos de infección causado por *P. palmivora*, en los diferentes de clones *in vitro* de *E. guineensis* y es posible describir el avance de la enfermedad mediante técnicas de microscopía convencional.

Es posible describir la respuesta a la infección de *P. palmivora* mediante pruebas histoquímicas y bioquímicas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. DESCRIPCIÓN DE LA PALMA DE ACEITE

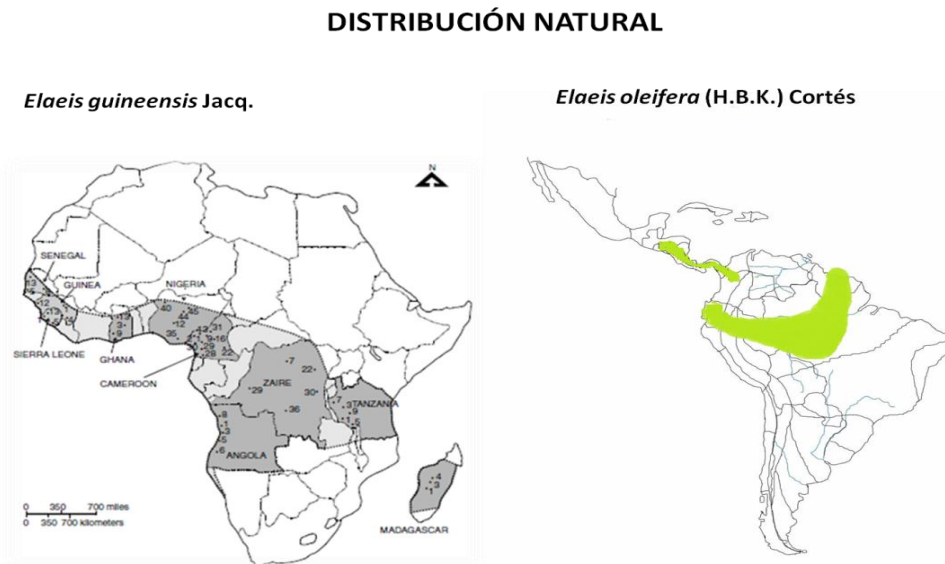
La palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq) se originó en las tierras altas de los montes Fouta Yallón (República de Guinea, África Occidental). Su distribución natural se presenta dentro de la llamada franja de la palma que ocupa los países de Sierra Leona, Liberia, Costa de Marfil, Ghana, Togo, Benin, Nigeria, Camerún, República Democrática del Congo y en zonas difusas de África Ecuatorial (Corley & Tinker, 2003). Pero la zona de origen y diversidad de *E.guineensis* se concentra en las selvas tropicales de Nigeria, Camerún, Congo y Angola (ver Figura 1) (Cochard et al., 2009) El rango altitudinal de *E. guineensis* presenta entre los 100 y 1000 m.s.n.m. (Corley & Tinker, 2003).

La palma de aceite pertenece al reino *Plantae*, división *Magnoliophita*, clase *Liliopsida*, orden *Arecales*, familia *Arecaceae*, a la cual se le reconocen alrededor de 190 géneros y 2364 especies (Govaerts & Dransfield, 2005). La familia se presenta dividida en 5 subfamilias: *Calamoidae*, *Nipoideae*, *Coriophoidae*, *Ceroxyloideae* y *Arecoidae*. (Dransfield et al., 2008); dentro de la última se encuentra la tribu *Cocoseae* y la subtribu *Elaeidinae* dentro de la cual está el género *Elaeis*. Compuesto por las especies *Elaeis guineensis* Jacq (palma africana) y *Elaeis oleifera* (Kunt) Cortes (palma americana). El género *Elaeis*, junto con la especie *E.guineensis* fue descrito por Jacquim en 1763. Posteriormente se le adjutó la especie *E.oleifera* al género (Corley y Tinker, 2003).

Es una planta perenne, monocotiledonea y de tronco (estípite) alto. Es monoica, con dos tipos de inflorescencia, la masculina y la femenina. Posee espinas cortas

en el peciolo y en el racimo frutal. El futo es de forma ovoide y mesocarpio carnoso; de este se extrae el aceite (Corley y Tinker, 2003).

**Figura 1. Distribución natural de las poblaciones naturales de *E. guineensis* y *E. oleifera*.**



La palma de aceite (*E. guineensis*) crece en un mismo eje y punto de crecimiento que es el meristemo y este es uno solo; se ubica en la parte más interna de la zona llamada cogollo (Adam et al., 2005). El cogollo se forma por el agrupamiento de las hojas más jóvenes, también llamadas negativas; dichas hojas son en su mayoría incoloras, de textura suave y muy compactas (Romero, et al., 2012). Para lograr observar la zona meristemática verdadera se debe retirar las hojas negativas y se llega a una zona en forma de rosa con color blanco (Adam et al., 2005).

La hoja madura de palma es pinnada y con un peciolo fibroso, a lo largo del cual crecen los folíolos o pinnas (Corley y Tinker, 2003). El peciolo se presenta dividido en dos partes, las cuales son el raquis el cual porta los folíolos y el peciolo, que es

más corto que el raquis y presenta solo espinas (Romero et al., 2012). El color del peciolo es variable, va desde el verde oscuro, verde amarillento, también amarillo ocre y con una franja oscura en el centro, que recorre todo el raquis. El raquis puede medir de 6 a 8 metros y presenta formas longitudinales que pueden ser lisa, prismada o semiprismada (Corley y Tinker, 2003).

El tallo no es leñoso, es fibroso, vascularizado, y se le conoce como estípite (Adam et al., 2005). Se puede apreciar un verdadero estípite, alrededor de los cuatro a cinco años de edad y puede alcanzar los 12 a 15 metros, al final de la etapa productiva de la planta (Figura 2) (Corley y Tinker, 2003).

**Figura 2. Palma africana *E. guineensis*. Aparece con racimo, fruto e inflorescencias masculinas y femeninas.**



Los órganos florales en *E. guineensis* se presentan en inflorescencias femeninas y masculinas (Figura 3). Las inflorescencias femeninas presentan 3 pétalos e igual número de sépalos; todo esto en una gran estructura donde se empaquetan todas las flores femeninas. El conjunto anterior se rodea de una gran bráctea que lo protege hasta la madurez sexual. Las flores se abren para esperar el polen y ser fecundadas; en este tiempo han perdido la bráctea (Corley y Tinker, 2003).

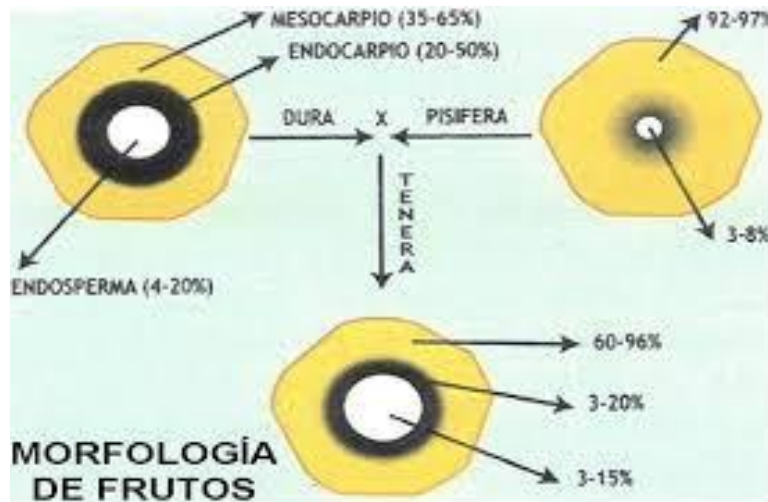
**Figura 3. (A) Inflorescencia masculina. (B) Inflorescencia femenina de la palma de aceite.**



La semilla de palma es una nuez recubierta de un mesocarpio aceitoso y suave; la nuez está formada de un endocarpio duro o cuesco, y de una a tres almendras (Corley y Tinker, 2003). Según el grosor del cuesco hay tres tipos de frutos así: *dura*, *tenera*, y *pisifera*. El fruto tipo *Dura*, posee un cuesco bastante grueso, de 2 a 8 mm de espesor y el contenido de aceite es de 35 a 55% del fruto. El fruto tipo *pisifera* posee un cuesco muy reducido o en la mayoría de casos no presenta cuesco. El fruto tipo *tenera* se obtiene del cruce de palmas tipo *dura* con palmas de tipo *pisifera*; el fruto tipo *tenera* es un fruto de cuesco relativamente delgado de

0,5 a 4 mm de espesor, almendras grandes y buena producción de aceite de 60 a 96% en el mesocarpio (Figura 4) (Beirnaert & Vanderweyen, 1941; Bernal, 2001).

**Figura 4. Morfología del fruto de palma. Clasificados según el grosor de cuesco**



## 2.2. ORIGEN Y GENERALIDADES DE LA INDUSTRIA DE LA PALMA DE ACEITE.

La llegada de la palma de aceite a América Latina se da con objetivos meramente ornamentales. Las primeras palmas llegaron procedentes del Jardín Botánico de Bogor en Malasia. Pero el potencial como fuente de grasa vegetal se observó a partir del uso dado al aceite de los frutos de palma por las comunidades esclavas africanas traídas al Brasil. Los esclavos africanos conocían como “*Azeite de dende*” al aceite de palma. Dicho aceite es aún usado con fines culinarios dentro de las comunidades afrodescendientes brasileñas (Corley y Tinker, 2003).

Alrededor de 1562 el aceite de palma se comercializaba en África Central como alimento para esclavos. Todo esto siguió así hasta 1804, cuando algunos comerciantes portugueses llevaron a Inglaterra el aceite de palma. Dichos

comerciantes ilustrados por las comunidades esclavas brasileras le vieron el potencial al aceite naturalmente rojo de la palma y redujeron la coloración y lo fraccionaron para el uso en jabones, velas, margarinas y lubricantes de maquinaria (Corley y Tinker, 2003).

Para 1860 el aceite de palma ya hacía presencia en ámbitos tanto alimenticios como industriales de la sociedad europea. El primer y principal producto donde se usaba el aceite de palma era el jabón; seguido de la lubricación industrial principalmente en el transporte ferroviario. Toda esta actividad industrial produjo un incremento en la demanda del aceite de palma y a su vez incentivó el comercio y ya en 1911 ingresaron al mercado europeo 232.000 toneladas de aceite (Corley y Tinker, 2003).

En Colombia la palma de aceite en el siglo XIX, solo se utilizaba con fines ornamentales. No fue sino con los cultivos de la United Fruit Company, en el Urabá a finales de los años 60's del siglo XX que se inicia el cultivo con fines comerciales (Guerra, 1987).

Los aceites vegetales se han ganado un lugar en el comercio y la industria, especialmente la palma de aceite, debido a la variedad de productos obtenidos de su fruto (Arondel et al., 2012; Corley & Tinker, 2003). Tal es la versatilidad del aceite de palma, que se obtienen desde jabones, lubricantes industriales, desengrasantes, combustibles tanto sólidos como líquidos, biocombustibles (biodiesel) y hoy en día el aceite de palma ocupa el 60% del volumen comercializado de aceites vegetales en el mundo (Basiron, 2007). En la alimentación hace parte de una gran variedad de productos y se generan en forma de margarinas, manteca y especialmente aceite para frituras (Basiron, 1999). Además está presente en la industria cosmética, en la farmacéutica y en la medicina alternativa (Gupta, 2012).

El cultivo de oleaginosas en el mundo ha crecido vertiginosamente. Uno de los cultivos oleaginosos que más ha crecido es la palma de aceite. Todo esto dado que es la oleaginosa más productiva por hectárea al año en promedio (4.1 t de aceite por hectárea al año). También los mayores rendimientos en aceite refinado peso a peso y por hectárea (48% del peso cosechado). De acuerdo con el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), la producción total de aceite en el 2014 fue de 175,65 millones de tm (toneladas métricas) con el aceite de palma en primer lugar (62,44 millones de tm) seguido del aceite de soya (47,37 millones de tm) y el aceite de brásicas oleaginosas (colza) ( 26,98 millones de tm)<sup>1</sup> ().

En Colombia, el cultivo de palma de aceite se ha incrementado a partir de los años 60; esto debido a la alta rentabilidad del cultivo y su adaptación al medio tropical colombiano.

Debido a la rápida expansión en el paisaje agrario colombiano de dicho cultivo, y los retos que ha afrontado para su avance fue necesario agremiar a los cultivadores dentro de la Federación de Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite (FEDEPALMA <http://web.fedepalma.org/>). Y a su vez para afrontar los retos productivos y administrar la investigación interna de la palma de aceite se fundó la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite (CENIPALMA)<sup>2</sup>.

En el territorio nacional se diferencian cuatro (4) zonas palmeras. Dichas zonas tienen características climáticas y de suelos bien diferenciadas y son la Zona Norte, Central, Suroccidental y Oriental (Figura 5).

---

<sup>1</sup> UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE Oil crops yearbook [en línea] disponible en: <http://www.ers.usda.gov/data-products/oil-crops-yearbook.aspx#.U55laf15Mzc>

<sup>2</sup> Cenipalma [en línea] disponible en: <http://www.cenipalma.org/>

**Figura 5. Zonas palmeras de Colombia.**



### **2.3. PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA**

El cultivo de palma de aceite en Colombia, presenta actualmente varias problemáticas fitosanitarias. Dentro de las principales enfermedades cabe destacar la Pudrición de Cogollo (PC), la Marchitez Letal (ML), la Marchitez Sorpresiva (MS); las cuales tienen como particularidad que sin tratamiento, eliminan la palma enferma en poco tiempo (Martínez, 2010).

La marchitez letal (ML) se caracteriza por la pérdida de brillo en el fruto, pudrición de los racimos y las raíces, seguidos de una decoloración bronce y severa deshidratación de los folíolos que inicia en el ápice de las hojas más maduras y avanzan hacia las hojas más tiernas y cubren toda la palma (Martínez, 2010). Se sabe que el vector de la enfermedad es el Cixiido *Haplaxius* (ant. *Mindus*) *crudus* (Arango, et al. 2011); no se sabe con certeza que organismo es el transmitido por el vector (Martínez, 2010; Martínez et al., 2013). Esta enfermedad ha reportado pérdidas de individuos en cultivos de la Zona Oriental palmera, en los últimos 7 años.

La marchitez sorpresiva (MS) se observó en plantaciones de Surinam posteriormente se han reportado en Ecuador y Colombia (Martínez, 2010). La sintomatología es muy parecida a la de la marchitez letal. Pero se descarta la anterior, cuando se aíslan protozoarios flagelados de los tejidos en palmas enfermas, sobre todo en raíces (Martínez, 2010; Martínez et al., 2013). Se conoce como agente causal de la enfermedad el protozoario *Phytomonas staheli*; los cuales no se encuentran uniformemente sino principalmente en las raíces (Martínez, 2010). No se han reportado casos de palmas recuperadas luego de detectarse la enfermedad. Hasta ahora no se cuenta con reportes del total de daños causados por dicha enfermedad en Colombia.

Entre otras plagas importantes que afectan el cultivo de palma se encuentran el picudo de la palma *Rhincophorus palmarum*, los barrenadores del tallo *Strategus* *ssp*, el barrenador de las raíces *Sagalassa valida*, y diferentes lepidópteros defoliadores, además de algunos géneros de raspadores de fruto (Sánchez, 1990). Otras enfermedades que frecuentemente atacan la palma son de origen viral y se han reportado en mayor proporción en las plántulas de vivero de origen híbrido. Dichas enfermedades son el anillo clorótico y la mancha anular (Rojas et al., 2010).

**2.3.1. La pudrición de cogollo (PC)** Dentro de la problemática fitosanitaria, la principal enfermedad en Colombia es la pudrición de cogollo (PC), ya que ha generado enormes pérdidas para el sector palmero colombiano (Corredor et al. 2008). Se sabe que la PC afectó ampliamente la región del Urabá, en los años 60; donde devastó alrededor de 2800 hectáreas de cultivo. Lo anterior concretamente en el municipio de Turbo (Antioquia).

La devastación ocurrió en menos de 5 años y sacó a la región noroccidental del mapa palmero colombiano (Franqueville, 2001). El registro de influencia de la enfermedad en la zona de Tumaco (Nariño) entre el 2007 y el 2008, muestra que pasó del 8.3% al 58% del área evaluada con presencia de la enfermedad; (Corredor et al., 2008).

La problemática de la pudrición de cogollo (PC) se ha abordado de diversas formas; una de estas y quizás la más drástica es la erradicación de las palmas afectadas pero la opción planteada significa desaparecer hectáreas completas de cultivo (Sarria, Torres, Aya, Ariza, Rodríguez, et al., 2008). El caso anteriormente expuesto se presentó en la zona occidental (Tumaco, Nariño) donde se vieron afectadas 36.934 hectáreas (Corredor et al., 2008).

Se sabe que al 2015, la PC ha devastado 70.000 hectáreas sembradas con palma en los municipios de Puerto Wilches (Santander) (Figura 6), Cantagallo (Sur de Bolívar) y Tumaco (Nariño). Lo anterior ha impactado en la economía regional, dejando sin ingresos directos a 16.000 campesinos que dependían del cultivo de palma<sup>3</sup>.

Según Fedepalma las pérdidas económicas al 2015 equivalen a 2,3 billones de pesos, esto sólo teniendo en cuenta las pérdidas para Santander y el Sur de

---

<sup>3</sup> . VANGUARDIA Fedepalma pide redoblar esfuerzos para enfrentar PC [en línea] disponible en: <http://www.vanguardia.com/economia/local/316658-fedepalma-pide-redoblar-esfuerzos-para-enfrentar-pc>

Bolívar. Dicha cifra equivale al 5% del PIB de Santander. La enfermedad ya afectó 37.900 hectáreas y conllevó a la pérdida de 11.000 empleos rurales directos e indirectos. Para atacar la problemática en la zona se firmó un convenio entre el Minagricultura, Fedepalma y el ICA, que involucra la inversión de 5.023 millones de pesos, en asistencia técnica para hacerle frente al problema en la zona central<sup>4</sup>.

**Figura 6. Cultivo de palma afectado por la PC en Puerto Wilches, Santander.**



Fuente: VANGUARDIA LIBERAL. Gobierno llegara a Puerto Wilches para tomar acciones contra la PC [en línea] disponible en: <http://www.vanguardia.com/santander/barrancabermeja/273020-gobierno-llegara-a-puerto-wilches-para-tomar-acciones-contra-la-pc>

Actualmente para rescatar una palma enferma con PC el procedimiento que se realiza es la remoción de los tejidos afectados (Cirugía). Cuando se logra identificar la enfermedad en fases tempranas, se retira solo la hoja-flecha afectada y con esto es suficiente. Pero cuando la enfermedad avanza a gran parte del cogollo, es necesario retirar todo el tejido necrosado y dejar al descubierto el meristemo. Luego de ello se procede a asperjar con hipoclorito el área expuesta, flamear y proteger el meristemo hasta su rebrote de hojas (Torres et al., 2008).

---

<sup>4</sup> VANGUARDIA La PC en Santander deja pérdidas por 23 billones [en línea] disponible en: <http://www.vanguardia.com/economia/local/307162-la-pc-en-santander-deja-perdidas-por-23-billones>

La opción con la que se hace frente a la problemática de la PC en regiones de alta incidencia es la siembra del híbrido interespecífico OxG, esto como una opción para reponer la industria aceitera de las zonas afectadas. Este híbrido proviene de cruzar especie americana *E. oleifera* con la especie de africana *E. guineensis*. Los híbridos que se han venido sembrando son los cruces que han mostrado tolerancia a la enfermedad (Meunier, 1991). Aunque dichos híbridos toleran la enfermedad, estos presentan diversas situaciones desfavorables propias de la hibridación para considerarlos como el reemplazo ideal. Las situaciones que presentan son menor tasa de extracción de aceite, crecimiento vigoroso y deficiente polinización natural. Todo esto limita las posibilidades como una opción de reemplazo en la industria aceitera, que se ha desarrollado en torno al cultivo de *E. guineensis* (Alvarado, et al. 2013). Además de todo esto las plántulas en vivero se han visto afectadas por enfermedades de tipo viral que reducen la viabilidad de las palmas próximas a la siembra tales como la mancha anular y el anillo clorótico (Peña et al., 2010).

La pudrición de cogollo se ha entendido como un complejo, ya que durante el desarrollo de la enfermedad confluyen diversos microorganismos (Sarria, et al., 2008b). En el marco de las investigaciones realizadas por Cenipalma, encaminadas al estudio del complejo de la PC; se lograron aislar algunos microorganismos de las áreas afectadas de la palma. Tales como *Thielaviopsis ssp*, *Fusarium ssp*, *Rhizoctonia ssp*, *Phytum ssp* (Sarria et al., 2008b). Luego de diversos estudios dirigidos por Cenipalma, se concluyó que el oomiceto *Phytophthora palmivora*, es el agente iniciador de la enfermedad. Según Sarria, et al., 2008 a, b, dicho microorganismo como agente iniciador, le da vía a otros para que agraven el síndrome y conlleve la pérdida del meristemo y con esto a toda la palma.

Se conoce de factores abióticos que generan una predisposición a ataque de la enfermedad, entre ellos el más importante es las altas precipitaciones (Arias, et

al., 2014). Otra circunstancia que predispone al aumento de la severidad de la enfermedad en los cultivos, es un indebido plan de fertilización (Martinez, 2008). También aporta dificultades en la recuperación de palmas afectadas, el bajo drenaje del suelo (Drenth, et al., 2013). Se tiene evidencia que en la zona norte la zona palmera más seca del país es donde se presenta la menor incidencia de pudrición de cogollo (Torres et al., 2008).

Hay evidencias circunstanciales acerca de vectores que pueden transportar al oomiceto *P. palmivora* entre palmas. Luego de una inspección en lotes de las diferentes zonas palmeras de Colombia; se observaron sobre las hojas posturas de insectos. Las posturas correspondieron con insectos de la familia *Tettigoniidae*. Por observaciones controladas en campo tanto en palmas de vivero como adultas se ha logrado observar en la flecha, vínculos entre la ovoposición y síntomas iniciales de la PC (Torres, et al., 2008).

#### **2.4. CARACTERÍSTICAS Y BIOLOGÍA DE *PHYTHOPHTORA PALMIVORA*.**

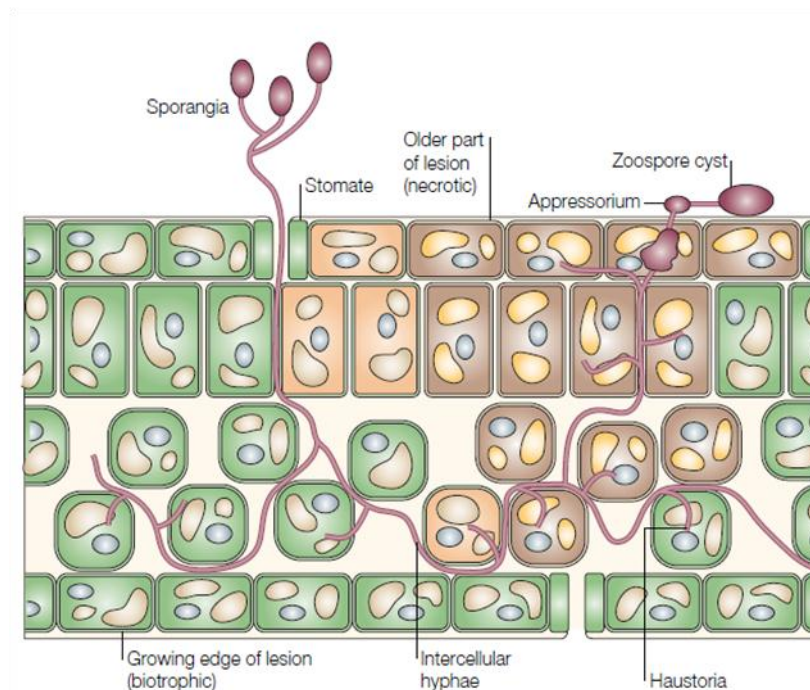
El patógeno de estudio es el oomiceto *Phytophthora palmivora*, el cual pertenece al filo *oomycota* y clase *oomycetes*. El grupo *Oomycota* ha sido objeto de estudio ya que a este filo pertenecen especies tales como *P. infestans*, *P. sojae* y *P. palmivora*; las cuales revisten importancia económica por los daños que causan a los cultivos y que anualmente representan grandes pérdidas (Beakes, et al., 2012).

El filo *Oomycota* comparte características con los hongos, tales como la captación de nutrientes (heterótrofos) y la presencia de micelio. Pero se han observado varias diferencias: presentan un talo diploide y realizan meiosis en los gametangios en desarrollo. La pared celular de los *oomycota* está compuesta de celulosa. Hay grandes diferencias a nivel metabólico y bioquímico con los hongos

verdaderos, además que la reproducción sexual es más cercana a las algas (Cepero et al., 2012).

El oomiceto *P. palmivora* posee un ciclo de vida característico del género de tipo hemibriótrofo, significa que dicho organismo se dedica a crecer invadiendo los tejidos del hospedero sin destruirlo, burlando el sistema defensivo de la planta para después de un tiempo producir la muerte del tejido invadido (Figura 7) (Giraldo y Valent, 2013).

**Figura 7. Ciclo de infección del género *Phytophthora*.**



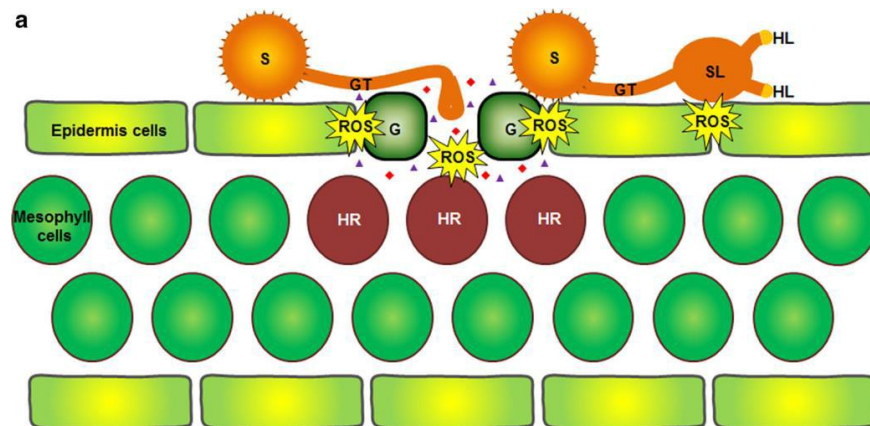
Fuente: (Judelson y Blanco, 2005)

El ciclo de infección de *Phytophthora* es el ciclo convencional de los oomicetes. Se sabe que el género *Phytophthora* inicia el ataque a los tejidos vegetales por medio de la zoospora; que a su vez es estructura de invasión (Judelson y Blanco, 2005). Puesto que es una estructura reproductiva móvil y genera dispersión amplia del patógeno. La zoospora hace el reconocimiento de la superficie del huésped

por medio de atracción quimiotactil donde interviene el ión  $\text{Ca}^{2+}$  y es la diferencia de cargas entre la membrana celular y la zoospora la que genera el aferramiento a la superficie de la planta (Shaw & Hoch, 2007). Luego de este aferramiento las zoosporas pierden sus flagelos y se enquistan (Hardham, 2001). La formación del apresorio se genera luego del enquistamiento de la célula, y por medio del tubo germinativo que no requiere estimulación externa (Judelson & Blanco, 2005). El apresorio es el punto de inicio de la colonización de los tejidos del hospedador y a partir de ahí *Phytophthora ssp* lanza las hifas invasivas, que se ubican en las zonas intercelulares (Giraldo & Valent, 2013).

La parte biótropa del ciclo vital de *Phytophthora ssp* se desarrolla por medio de la hifa invasiva de la cual se desarrolla el haustorio (Figura 8), la cual es la estructura de ataque a la célula vegetal (Judelson y Blanco, 2005). El haustorio penetra en la pared celular vegetal e invade la célula y posteriormente le extrae los nutrientes (Yang, et al., 2013).

**Figura 8. Proceso de invasión a la planta de un oomiceto hemibiótropo. (Yang, et al., 2014). GT-Tubo germinativo. S-Espora. SL-Apresorio. HL-Túbulo germinativo.**



La fase necrótropa se produce luego de la liberación masiva de nutrientes provenientes de los tejidos vegetales (Yang, et al., 2014). Esta fase es

aprovechada por *Phytophthora* ssp para desarrollar estructuras reproductivas sexuales como son los oogonios y las estructuras reproductivas asexuales (zoosporas) y las estructuras de resistencia como las clamidosporas (Judelson y Blanco, 2005). El daño de tejidos ocurre dentro de la fase anteriormente mencionada y termina por afectar la productividad de la palma cuando la infección alcanza el meristemo y produce la muerte de la palma (Drenth & Guest, 2013).

## **2.5. SISTEMA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS.**

Frente al ataque del patógeno las plantas hospederas responden sintetizando sustancias químicas que reducen la viabilidad del patógeno o enzimas que le hacen frente al avance del patógeno (Thordal Christensen, et al., 1997). Una de las principales respuestas de hipersensibilidad a los patógenos es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) tales como el peróxido de hidrogeno y anión superóxido, sustancias con efecto antipatógeno y señalizadoras de la cascada de eventos que componen la respuesta hipersensible (Yang et al., 2014).

El peróxido de hidrógeno se produce como respuesta a la invasión de tejidos por parte de patógenos y se acumula en los tejidos atacados para evitar el desarrollo de los mismos. Las ROS hacen parte de la llamada respuesta hipersensible primordial o la primera barrera de defensa, normalmente estas sustancias se sintetizan en el mesófilo de la hoja ((Trujillo, et al., 2004; Zhang et al., 2011).

La segunda respuesta contra patógenos se compone de una batería de enzimas que actúan directamente sobre la pared celular del patógeno y la degrada (Romero et al., 2008). La caracterización de materiales resistentes a patógenos se deriva de reconocer dichas enzimas y la presencia en las plantas (Shetty, et al., 2008; Shetty et al., 2009). Se sabe que la acumulación de estas enzimas se localiza cerca a los 35tomas y en el mesófilo de la hoja (Rech, et al., 2012).

La tercera respuesta de hipersensibilidad está relacionada con la síntesis de compuestos que retardan el crecimiento de estructuras de patógenos o evitan que se desarrollen. Una de estas es el ácido cinámico, el cual detiene la germinación de esporas fungícas (Rech et al., 2012). La detección del ácido cinámico se hace indirectamente por medio de la determinación de la actividad de la enzima que lo sintetiza, llamada fenilmetilamonio liasa (PAL) (D. Romero et al., 2008).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de grado hace parte del proyecto de investigación “Estudio del proceso de infección de la palma de aceite por *Phytophthora palmivora* a través de técnicas histopatológicas y de transformación genética utilizando proteína fluorescente verde” desarrollado por CENIPALMA y financiado por COLCIENCIAS (Convenio No 713/11) Y hace parte de la tesis de doctorado titulada: Identificación y análisis de genes candidatos relacionados con la resistencia a *Phytophthora palmivora* en la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq). Realizado por la estudiante de doctorado de la Universidad Nacional de Colombia, Kelly J. Ávila M. El trabajo se realizó en el Campo Experimental Palmar de la Vizcaína de Cenipalma, localizado en el corregimiento Peroles, zona rural de Barrancabermeja.

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizó material de cultivo *In vitro* de palma de aceite. Un total de seis (6) Ortets con diferentes condiciones de susceptibilidad o resistencia a la infección por *P. palmivora*. Fueron seleccionados los ortets codificados con los números 1, 28, 33, 34, 35, 57. Todos los Ortets proceden del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del programa de Biología y Mejoramiento de Cenipalma.

Paralelo a esto se realizó un ensayo de inoculación controlada de clones con *P. palmivora*. Se observó que los ortets 1, 28, 34 y 35 fueron los más resistentes y que los ortets 33 y 57 fueron los más susceptibles.

Los clones *in vitro*, obtenidos luego de un proceso de mínimo 3 años en laboratorio, procedían de palmas que en condiciones de campo presentaron resistencia y/o susceptibilidad a la Pudrición de Cogollo.

### **3.2. MATERIAL DE INOCULACIÓN**

Se utilizó el aislamiento de *P. palmivora* de código PCZC 145 procedente de Puerto Wilches, Santander. Este aislamiento fue colectado y mantenido en condiciones de laboratorio por personal del programa de fitopatología de Cenipalma.

### **3.3. ACTIVACIÓN DEL PATÓGENO**

El proceso de activación de *P. palmivora* se realizó utilizando frutos de pera (*Pyrus communis*) maduros; los cuales pasaron por un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio (3%), durante 4 minutos. Posteriormente se lavaron en agua destilada estéril por 3 minutos. Pasado esto se lavaron en etanol (70%). Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril por 4 minutos. Luego se realizaron dos incisiones en forma de triángulo. En una de las dos incisiones se depositó un disco de micelio de aproximadamente 4 mm de diámetro del patógeno. La pera inoculada se llevó a reposo en cámara húmeda. Esta cámara constaba de un vaso de precipitado, un papel absorbente y una caja de petri pequeña; todo el conjunto debidamente esterilizado y dentro de una bolsa de cierre hermético. La pera en cámara húmeda (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se dejó en reposo de 4 a 7 días.

Luego de transcurrido el tiempo de reposo se procedió a aislar el micelio crecido sobre la pera retirando fragmentos del fruto con micelio evidente. Los fragmentos

de fruto se cultivaron de 8 a 10 días en medio agar-zanahoria (60 o 100g de zanahoria por litro) o jugo de tomate (V8®Campbells) y 15g de agar por litro. Eventualmente se recuperaba tejido necrosado de clones *in vitro* inoculados y se depositaban en medio de cultivo para permitir el crecimiento de micelio. Eventualmente se realizaban activaciones en frutos de cacao (*Theobroma cacao*), bajo las mismas condiciones de la pera.

**Figura 9. Pera inoculada con *Phytophthora palmivora* en cámara húmeda.**



Las cajas de cultivo se mantuvieron los dos primeros días en condiciones de oscuridad y a 28°C; posteriormente del día 3 al día 10 se mantuvieron en las condiciones ambientales del Laboratorio de Microbiología de Suelos de Cenipalma aproximadamente a 27°C.

La inducción de zoosporas se realizó tomando los cultivos crecidos en cajas de petri durante 10 días. A los cultivos se les añadió agua a 4°C y posteriormente se expuso a luz blanca durante 20 minutos. La cantidad de agua añadida estuvo acorde al tamaño de la caja petri. Todo el proceso anterior hace que se fracture la papila del esporangio de *P. palmivora* y libere las zoosporas. Se cuantificó la solución de zoosporas en cámara de Neubauer®.

Se calculó la concentración de zoosporas por mililitro, mediante la siguiente fórmula ( $\Sigma=(A+B+C+D) \times 2000$ ) las letras en mayúsculas hacen referencia a la posición en los cuadrantes en la cámara.

### **3.4. PROCESO DE INFECCIÓN DE TEJIDOS**

Para el estudio de la actividad infecciosa de *P. palmivora* en tejidos de palma se extrajeron discos de tejido foliar de aproximadamente 0,25 cm de diámetro (sacabocados mediano) según Asselbergh et al., 2007; que fueron obtenidos de los ortets 1, 28, 33, 34, 35 y 57. Los discos fueron colocados en diferentes tubos de ensayo falcon® de 15 ml debidamente rotulados según el Ortet. Dichos tubos contenían aproximadamente 10 ml de agua estéril; los cuales se dejaron en reposo *Overnigth*.

Las condiciones de agua *Overnigth* son convenientes cuando hay un gran número de muestras para procesar y por operatividad se hacen en una jornada anterior a la inoculación. Además, este paso ayuda a “aliviar” las consecuencias del daño mecánico causado por el corte.

Para la inoculación, previamente se realizó una inducción de zoosporas durante 20 minutos y se utilizó una concentración de 300.000 zoosporas/mililitro. Tres (3) discos de hoja de palma por ortet fueron depositados en placas de microcultivo de 6 pozos. La inoculación de los discos se realizó tomando una alícuota de solución de zoosporas de 2,5 ml (a 300.000 zoosporas/mililitro) y sirviendo con micropipeta en cada uno de los pozos. Los discos de control fueron inoculados con agua destilada estéril a temperatura ambiente.

Se realizó un seguimiento al proceso de infección en tiempos de 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas.

Los montajes previamente descritos se dejaron en reposo a la temperatura ambiente del Laboratorio de Microbiología de Suelos de CENIPALMA.

### **3.5. DETECCIÓN MICROSCÓPICA DE ESTRUCTURAS DE *P. PALMIVORA* EN TEJIDOS DE PALMA DE ACEITE, MEDIANTE TINCIÓN HISTOLÓGICA.**

Se tomaron los tejidos de palma previamente inoculados y se dispusieron en reposo e inmersión dentro de la solución de zoosporas. Se retiraron los tejidos a las 2, 4, 6, 12, 24, 48 horas. Posterior a esto se retiraron los tejidos de la solución y se llevaron a clareo en la solución de clareo A (etanol (Merk. Darmstadt; Alemania), ácido acético (Merk. Darmstadt; Alemania) 3:1). En dicha solución se dejaron en agitación en shaker *overnight* para clareo; posteriormente se les cambió a la solución de reposo (etanol (Merk. Darmstadt; Alemania), ácido acético (Merk. Darmstadt; Alemania), glicerina (Panreac. Barcelona; España) 5:1:1). Luego de transcurrido el tiempo se llevó a la solución de azul de tripano en lactofenol (Ácido láctico (Merk. Darmstadt; Alemania), glicerol (Panreac. Barcelona; España), fenol (Amresco. Solom-Ohio; EUA), agua destilada, azul de tripano (Sigma-Aldrich. Steinheim; Alemania) (0,4%) 1:1:1:5:2) (Saha et al., 1987).

Se realizaron los montajes histológicos utilizando láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos. Se revisaron las estructuras en los microscopios Nikon Eclipse 50i, Leica DMI 6000B. Luego de reconocidas cada una de las estructuras del patógeno se procedió a contar dichas estructuras y se registró en una planilla los resultados de los conteos.

### **3.6. DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO MEDIANTE PRUEBA DAB (3,3'-DIAMINOBENZIDINA).**

**3.6.1. Procedimiento de inoculación de tejidos de palma según Asselbergh et al., 2007.** Se tomaron discos de tejido foliar de los 6 grupos clonales (1, 28, 33, 34, 35, 57). Se llevaron a hidratación en tubos falcon<sup>®</sup> de 50 ml que contenían aproximadamente 40 ml de agua por más o menos 12 horas. Las muestras de cada ortet se separaron en tubos independientes.

Para la inoculación del patógeno se realizó la inducción de zoosporas mediante el protocolo anteriormente referenciado.

Se tomaron 2 placas para microcultivo Corning<sup>®</sup> de 6 pozos (6 well-plate) y en cada pozo se depositaron 3 discos de tejido foliar. Posteriormente se inocularon por medio de pipeta de 5 ml en cada placa por los tres pozos superiores con 2,5 ml de solución de zoosporas calibradas a 300.000 zoosporas/ml. En los pozos inferiores los discos se inocularon con agua; esto como control.

Terminado el procedimiento de inoculación, se esperó el transcurso de los tiempos de 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas.

**3.6.2. Preparación del reactivo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (1mg/ml)**  
Modificado de Thordal Christensen et al., 1997; y Daudi y O'Brien, 2012.

Para la preparación del reactivo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich. Steinheim; Alemania) se tomaron 2,5 ml de HCl (Merk. Darmstadt; Alemania) y 2,5 ml de buffer fosfato ( $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ ) (Merk; Darmstadt, Alemania) pH 7,5. Se pesaron 50 mg de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y se colocaron en un tubo falcon de 50 ml con el ácido y el buffer. Se llevó el tubo cubierto de papel aluminio al

baño ultrasónico (E15H) (Elma-Elmasonic) por 20 min a 34 KHz de frecuencia. Posteriormente se le agregaron 45 ml de agua destilada estéril.

**3.6.3. Reacción de los tejidos en la prueba DAB** Para la detección de peróxido de hidrogeno en los tejidos vegetales, se llevaron los grupos de tres discos en cada pozo y tiempo indicado a una placa nueva. Se añadieron 2 ml de solución DAB a cada pozo. Posteriormente se forraron las placas con los discos con papel aluminio. Lo anterior con el objetivo de aislar los tejidos y el reactivo de la luz. Posteriormente se llevaron a vacío durante 20 min a 600 mm de Hg de presión. Transcurrido dicho tiempo se llevaron al shacker a temperatura ambiente por 6 horas.

Luego de transcurridas las 6 horas se sacaron los discos de la solución DAB. Se llevaron tubos falcon de 15 ml guardando el orden y número de ortet de las placas. Posteriormente se clarearon mediante la solución de clareo para DAB (etanol (Merk. Darmstadt; Alemania), ácido acético (Merk. Darmstadt; Alemania), glicerol (Panreac. Barcelona; España) 3:1:1). Posteriormente se analizaron las muestras y se obtuvieron fotografías de las mismas. Se calculó el porcentaje de coloración observando la cantidad de precipitado sobre el tejido.

### **3.7. DETECCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO ( $O_2^-$ ) MEDIANTE NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT).**

Se tomaron discos de hoja de los ortets 57, 28 y 34. Se realizó el mismo tratamiento para el ítem anterior.

**3.7.1. Preparación del reactivo Nitroblue Tetrazolium** Según el protocolo de Hüchelhoven y Kogel, 1998 modificado.

**3.7.2. Preparación de las soluciones auxiliares:** Azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) Sigma-Aldrich. Steinheim; Alemania.

Se pesaron 65 mg de azida de sodio (Sigma-Aldrich. Steinheim; Alemania) y se llevaron a volumen con 10 ml de agua destilada estéril.

Buffer fosfato

Se pesaron 440 mg de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merk. Darmstadt: Alemania) y 170 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merk. Darmstadt; Alemania); Se llevaron a volumen de 90 ml de agua destilada estéril. Se ajustó el pH a 6.4 con HCl 0.1M.

**3.7.3. Preparación de la solución de Nitroblue Tetrazolium** Se agregó una pastilla (10 mg de Nitroblue Tetrazolium Sigma-Aldrich. Steinheim; Alemania) a 9 ml de buffer fosfato. Se dejó hasta que la pastilla se disolviera. Posteriormente se le agregó 1 ml de azida de sodio.

**3.7.4. Reacción de los tejidos en la prueba con Nitroblue Tetrazolium** Se llevaron los discos a los plates (Corning<sup>®</sup> de 12 pozos) para tinción y se les añadieron 1,2 ml de solución de tinción a cada pozo. Se llevaron los plates con las muestras a la cámara de vacío a 600 mm de Hg de presión por 15 minutos. Posteriormente las muestras fueron expuestas a luz continua durante 20 minutos.

Se removió la solución de Nitroblue Tetrazolium. Se removieron las clorofilas por medio de lavados seriales de etanol al 96% y en condiciones de calor (80°C). Se obtuvieron imágenes de los discos y se cuantificó la coloración azul en los tejidos.

### 3.8. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

**3.8.1. Determinación de proteínas** Para la determinación de proteínas se empleó el Bio-Rad Protein Assay Kit II; según las especificaciones técnicas de dicho kit.

**3.8.1.1. Diseño de la curva de calibración:** Se pesó 15 mg de BSA (Albúmina Sérica Bovina) liofilizado y se aforó con 10 ml de agua destilada estéril. Se tomaron 100  $\mu$ l de la solución anterior y se aforaron a 1 ml con buffer fosfato de sodio pH 6,8. Esta era la solución madre de BSA para hacer la curva de calibración. Se realizó para cada concentración por triplicado con un patrón de BSA de 150  $\mu$ g/ml, preparando las mezclas de reacción como se presentan en la Tabla 1:

**Tabla 1 Cantidades necesarias para la curva de calibración con BSA.**

<b>BUFFER <math>\mu</math>l</b>	<b>BSA <math>\mu</math>l</b>	<b>Bio-Rad Protein Assay Dye</b>
800	0	200
780	20	200
760	40	200
740	60	200
720	80	200
700	100	200

Se colocó en un tubo de reacción de 2 ml la misma cantidad de buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 6,8. Se añadió la cantidad patrón de BSA y se homogeneizó con vortex por 10 segundos y se agregaron 200  $\mu$ l del tinte Bio Rad<sup>®</sup> (Bio Rad Protein Assay Kit II).

Se tapó el tubo y se invirtió suavemente cinco veces y así se evitaba la formación de espuma. Se dejó en reposo por 15 minutos y se determinó la absorbancia a 595 nm usando como blanco el buffer. Se construyó la gráfica de  $\mu$ g/ml proteína (X) Vs absorbancia a 595 nm.

**3.8.1.2. Preparación de las muestras:** Se maceraron las hojas frescas sin nervaduras con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. Se conservó a -70°C hasta el tratamiento final.

**3.8.1.3. Procesamiento de las muestras:** Se pesó aproximadamente 50 mg de macerado en un tubo falcon de 15 ml rotulado. Se realizó el procedimiento por triplicado. Se adicionó al macerado 5 ml de buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7,5. Se homogeneizó por dos minutos en vórtex sobre cama de hielo. Se incubó por una hora sobre cama de hielo. Luego se incubó por una hora sobre cama de hielo en agitador horizontal. Se centrifugó durante 30 minutos a 6000 rpm y 4°C. Se separó el sobrenadante (extracto proteico) para la determinación inmediata del contenido de proteína. Se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml, 800 µl de extracto proteico. Se agregaron 200 µl del tinte Bio-Rad Protein Assay Dye II, se tapó el tubo y se invirtió suavemente cinco veces. Se dejó en reposo 15 minutos.

Se sirvió 200 µl del contenido del tubo en cada celda de la placa de 96 pozos Corning<sup>®</sup>. Se repitió el proceso hasta completar 3 celdas. Se determinó la absorbancia en el Espectrofotómetro BioTek PowerWave XS a 595 nm y se realizaron las gráficas requeridas.

**3.8.2. Determinación de la actividad enzimática catalasa** Se maceraron hojas frescas sin nervaduras con N<sub>2</sub> líquido, hasta que se obtuvo un polvo fino. Se conservó el macerado a -70° C.

Luego de transcurridos los tiempos de infección y colectadas todas las muestras; se pesaron 50 mg por muestra en tubos eppendorf de 2 ml, cubiertos con papel aluminio y sobre cama de hielo. Se adicionó 1,5 ml de acetona al 80% v/v y a -10°C; se mezcló en vortex por dos minutos. Posteriormente se centrifugó durante 4 min a 6000 rpm y a 4°C. Se retiró el sobrenadante con pipeta pasteur. Se continuó todo el proceso hasta que se obtuvo el precipitado incoloro.

El precipitado se transfirió a tubo falcon de 15 ml y se hizo dos lavados con buffer fosfato de sodio 110 mM y pH 7,2 que contenía PVP-40 hasta que se completó 4,4 ml. Se agito en cama de hielo a 4°C en agitador horizontal. Se centrifugó por una hora a 6000 rpm y a 4°C. Se separó el sobrenadante para la determinación de proteína total y actividad catalasa.

Se colocó el extracto enzimático y las soluciones por 5 minutos a temperatura de 37°C.

**3.8.2.1. Determinación del peróxido remanente:** En tubos de ensayo de vidrio se colocó 1 ml de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,6. Se adicionó 250 µl de extracto enzimático y 600 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) y 1,235 M. Luego de que transcurrieron 5 minutos se adicionó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se calentó previamente un erlenmeyer con 10 ml de agua destilada y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado hasta que la temperatura llegó a más o menos 75°C. Se vertió el contenido del tubo de ensayo en el erlenmeyer. Se tituló gota a gota el contenido del erlenmeyer con permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) 10 mM estandarizado.

**3.8.2.2. Determinación de peróxido disponible:** Se hizo el mismo procedimiento que para peróxido remanente pero antes de adicionar el extracto se adicionó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado con el fin de inactivar la enzima.

Se reportó la actividad catalasa como  $UAE_{CAT} = \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{minutos} \times \text{mg de proteína}$ .

### **3.8.3. Determinación de la actividad enzimática peróxidasa.**

**3.8.3.1. Procesamiento de las muestras** Se maceraron hojas con los diferentes tiempos de infección hasta obtener un polvo fino. Se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para el tratamiento final.

Se pesaron 50 mg de macerado y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 ml cubierto con papel aluminio y rotulado por triplicado. Se agregaron 0,022g de PVPP (22% p/p). Se adicionó a cada tubo 1,5 ml de acetona 80% v/v a  $-10^{\circ}\text{C}$  y se mezcló en vórtex por 4 minutos. Se centrifugó durante 4 minutos a 6000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante con pipeta pasteur. Se colocó el sobrenadante en un frasco ambar. Se repitió el proceso de lavado con acetona hasta obtener un precipitado transparente. Se transfirió a un tubo falcon de 15 ml. Se hicieron lavados sucesivos con buffer fosfato de sodio 100 mM 3,82% p/v PVP-40, pH 7,2; Hasta que se completó el mínimo de 2 ml a  $4^{\circ}\text{C}$  y se agitó durante una hora sobre cama de hielo a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitador horizontal. Se centrifugó durante una hora a 6000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  de temperatura.

Se separó el sobrenadante (extracto enzimático) para la determinación de proteína total y actividad enzimática peroxidasa.

**3.8.4. Determinación de la actividad enzimática peroxidasa.** Se colocaron las soluciones y el extracto enzimático a  $37^{\circ}\text{C}$ . En la celda del espectrofotómetro de adicionaron 340  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8. Se agregaron 30  $\mu\text{l}$  de *o*-dianisidina de 0,5 mg/ml y se agitó. Se añadió 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  500 mM. Se agitó por volcamiento la celda previamente tapada. Se leyó la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesys 20 de Thermo Scientific; a 460 nm cada 5 segundos durante 120 segundos. El blanco eran 80  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50 mM 490  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8; 30  $\mu\text{l}$  de *o*-dianisidina 0,5 mg/ml.

La actividad se reportó como cambio de la absorbancia por minuto por miligramo de proteína.

### **3.8.5. Determinación de la actividad enzimática de la fenilamonio-liasa (PAL).**

Se maceraron las hojas de estudio procedentes de clones *in vitro* previamente inoculadas con el patógeno *P. palmivora* en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a 4°C.

Posteriormente se hicieron lavados seriados con acetona 80% y a -10°C y centrifugación a 6000 rpm durante 4 minutos; todo esto hasta alcanzar el precipitado blancuzco.

Posteriormente se almacenaron los macerados a -70°C en tubos eppendorf. Posteriormente se llevaron a agitación con buffer borato de sodio (100 mM y pH 6,5 a 4°C) por una hora. Luego de esto se llevó a centrifugación a 6000 rpm durante 30 minutos.

Posteriormente se sirvieron por triplicado en plates Corning<sup>®</sup> de 96 pozos y se llevaron al equipo de espectrofotometría BioTek PowerWave XS del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Cenipalma. Se leyó la absorbancia a 595 nm.

La actividad enzimática se reportó como nmoles de ácido cinámico/mg de proteína a 37°C.

### **3.9. PRUEBAS ESTADÍSTICAS**

Se realizaron tratamientos estadísticos a los datos arrojados en la determinación de las enzimas: catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y fenilamonio-liasa (PAL). Se realizó a cada grupo de datos por ortet la prueba ANOVA simple y el test de Duncan con  $P > 0,05$ . Todo esto por medio del programa IBM SPSS Statistics 23.

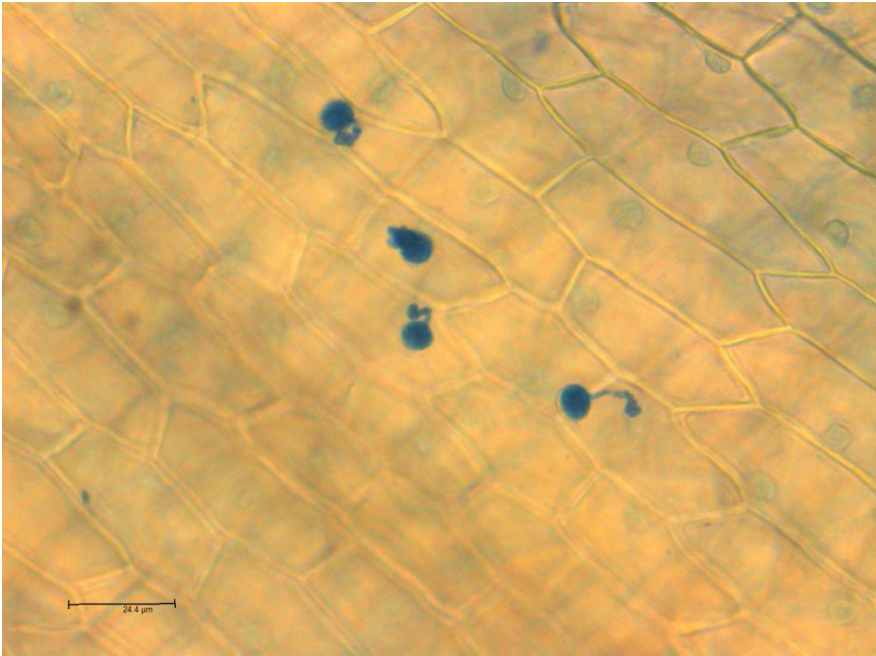
## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTRUCTURAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN DE *PHYTOPHTHORA PALMIVORA* EN TEJIDOS DE PALMA INOCULADOS

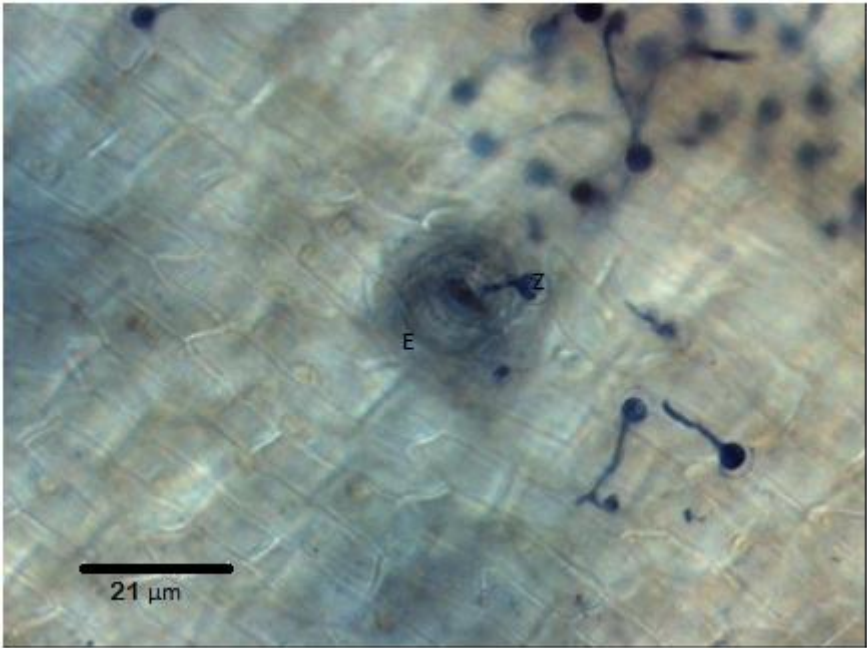
Se observaron quistes, protoapresorios, apresorios, hifas infectivas y haustorios. Dichas estructuras están asociadas a tiempos específicos de avance del patógeno en el tejido. También las estructuras anteriormente enumeradas son las características de la invasión del género *Phytophthora* en los tejidos receptores.

En la zoospora con dos horas de enquistamiento se logra apreciar un túbulo germinativo. Dicha estructura se asocia principalmente a las zonas de unión epidérmica también conocida como la sinclinal epidérmica. Esta primera aproximación a las dos horas permite apreciar la estructura inicial de ataque, la cual es el túbulo germinativo. Se pueden apreciar diferencias en las estructuras cuando se compara el desarrollo entre los tejidos inoculados de los ortets 34 y 57; ya que en el ortet 34 se presenta relativamente mas retrasado el ataque (Figura 10). En el ortet 57(Figura 11) el ataque se ve favorecido hacia los estomas.

**Figura 10. Ortet 34; zoosporas enquistadas 2 horas después de la inoculación.**

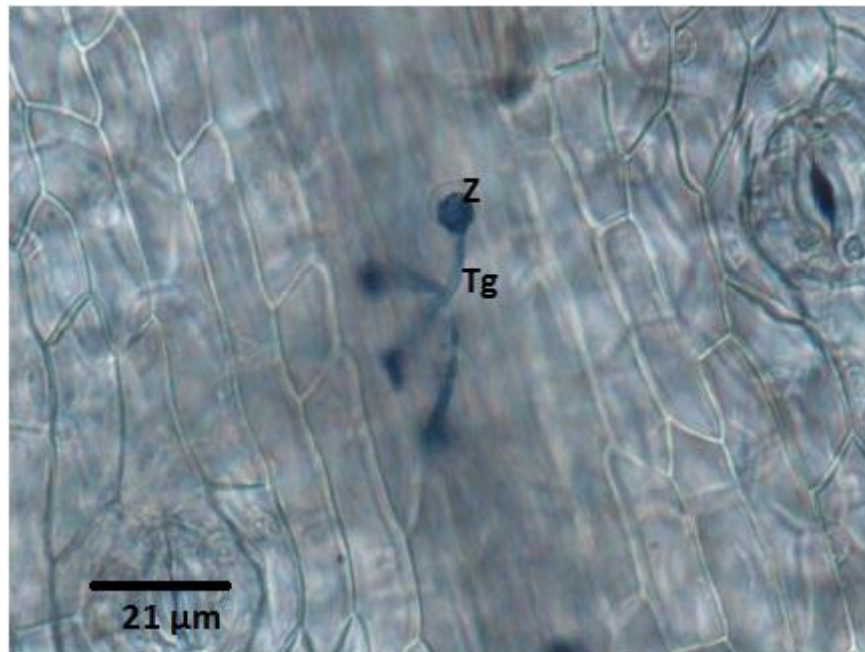


**Figura 11. Ortet 57; 2 horas después de la inoculación. Zoospora penetrando un estoma. E: Estoma. Z: Zoospora.**

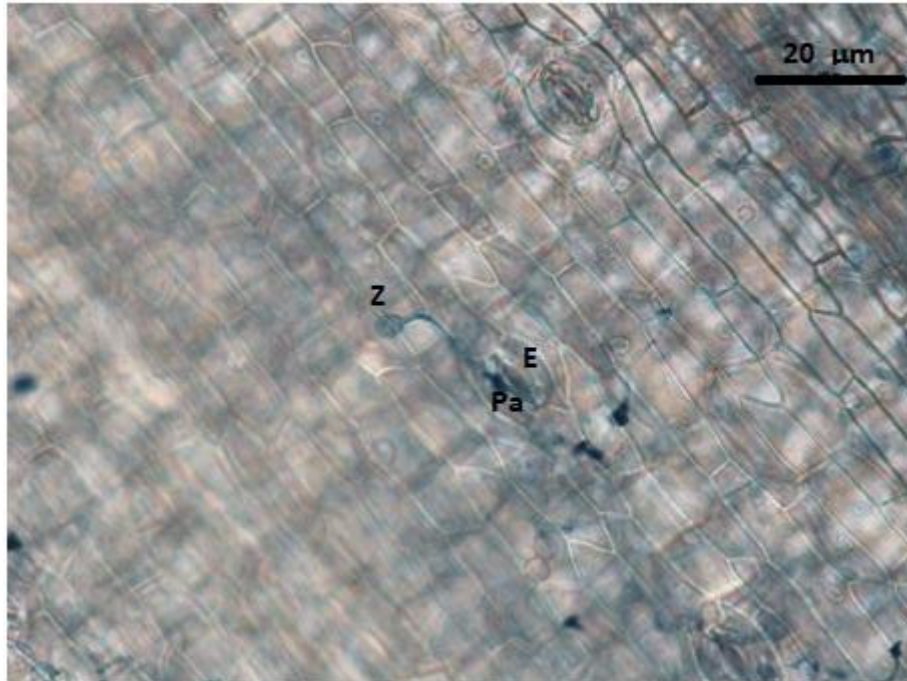


Cuando han transcurrido cuatro (4) horas luego de la inoculación se logra observar las zoosporas enquistadas y en proceso de fijación a la superficie del tejido. En este punto del ataque se logra apreciar un abultamiento en el túbulo germinativo que en el futuro formará el apresorio que para efectos de diferenciación se llamará en este tiempo protoapresorio. En los dos ortets observados se presentan dichas estructuras; en el Ortet 34 (Figura 12) se notan un poco menos desarrollado que en las zoosporas que atacan los tejidos del ortet 57 (Figura 13).

**Figura 12. Ortet 34; 4 horas después de la inoculación. Zoospora con protoapresorio sobre una nervadura. Z: Zoospora. Tg: Túbulo germinativo.**

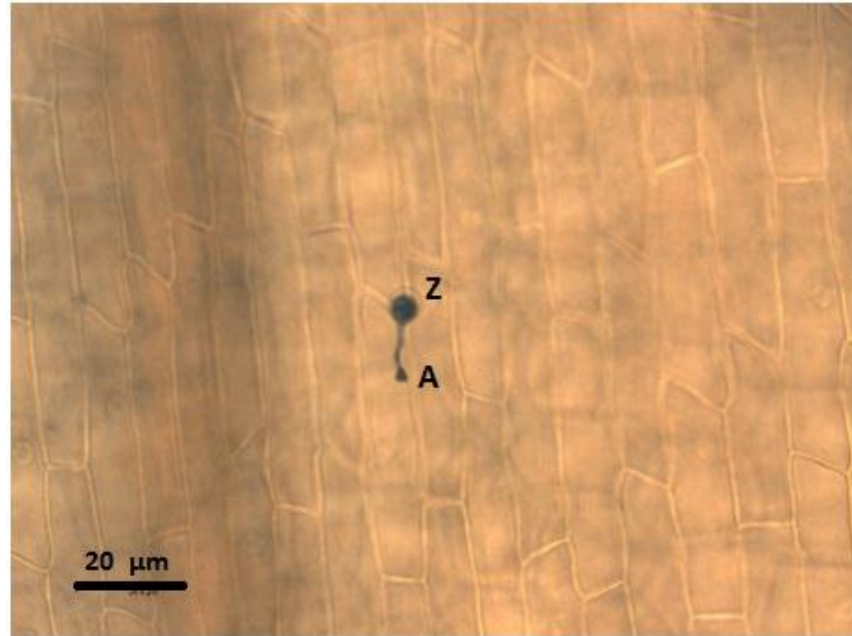


**Figura 13. Ortet 57. Transcurridas 4 horas después de la inoculación. Se aprecia una zoospora (Z) con protoapresorio (Pa) sobre un estoma (E).**

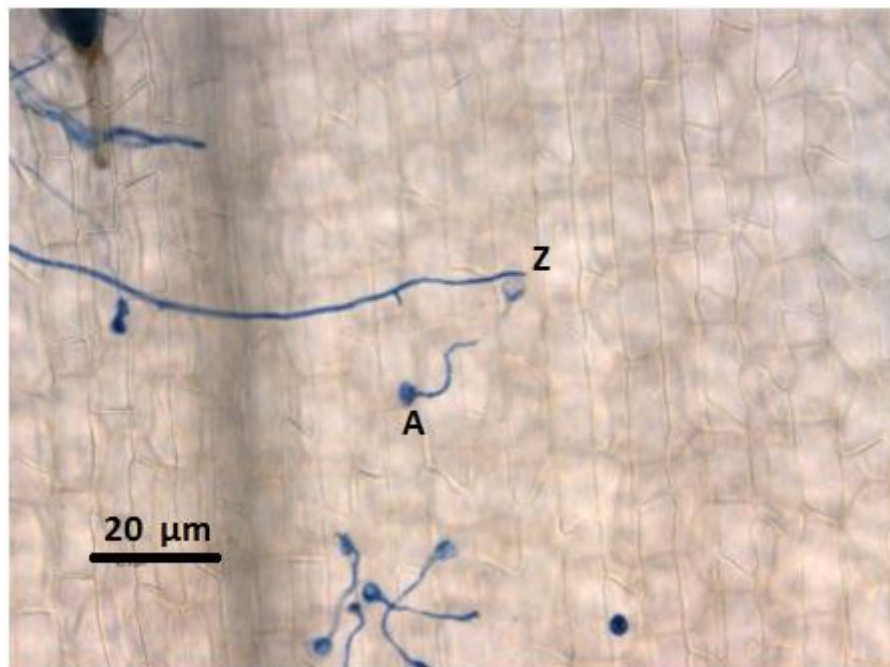


Luego de transcurridas 6 horas de infección, la zoospora presenta bien formado el apresorio sobre el túbulo germinativo. El apresorio se encuentra bien formado sobre las sinclinales celulares y se presenta casi del tamaño del quiste inicial. La estructura en mención recibe una fuerte coloración por medio del azul de tripano. Para el ortet 34 (Figura 14) se aprecia un apresorio, que aunque bien formado no muestra el mismo desarrollo que presenta el apresorio formado sobre el tejido del ortet 57 (Figura 15).

**Figura 14. Ortet 34 luego de transcurridas 6 horas de la inoculación. Se evidencia un apresorio bien formado.**



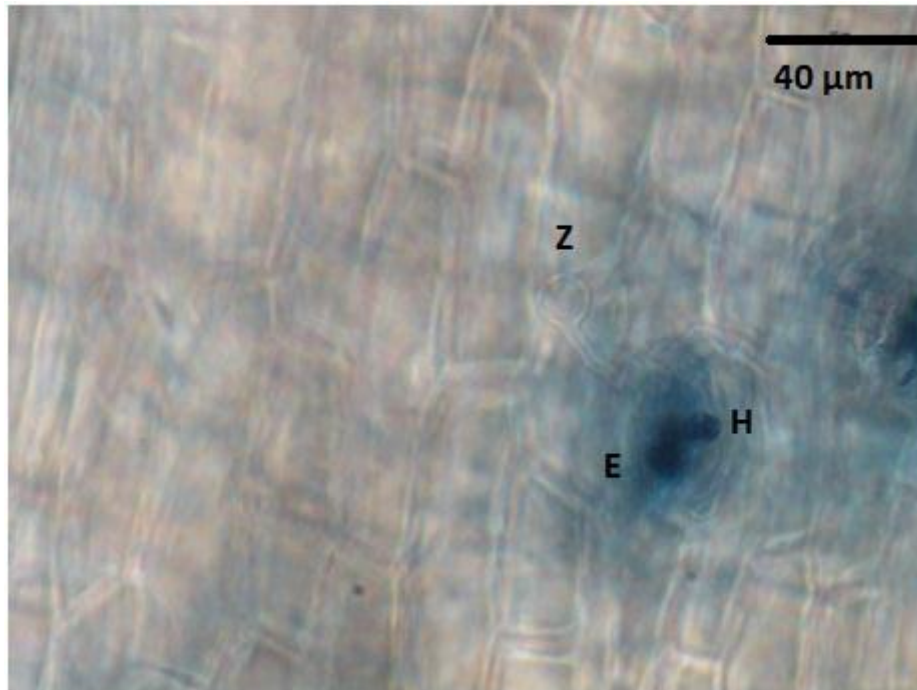
**Figura 15. Ortet 57 después de 6 horas de inoculación. Se evidencian zoosporas (Z) con un apresorio (A) bien formado y bien desarrollado.**



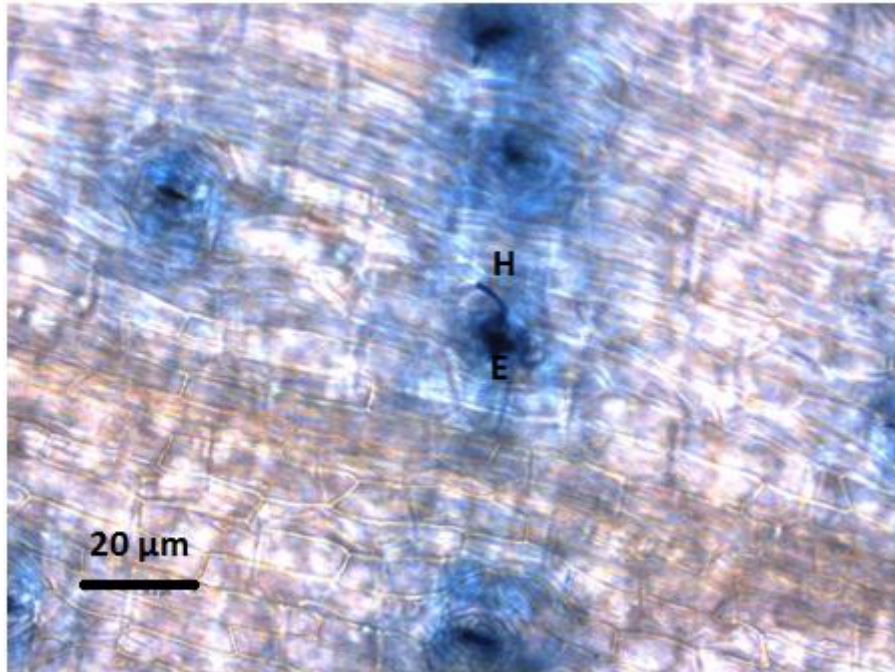
Luego de transcurridas 12 horas después de la inoculación se aprecia en el ortet 34, estructuras de *P. palmivora* luego de establecida la zoospora con la primera hifa en la parte externa de la lámina foliar (Figura 16). En el ortet 57 ya no se aprecian estructuras de la zoospora pero si se aprecian hifas miceliares brotando de los estomas previamente invadidos (

Figura 17).

**Figura 16. Ortet 34. 12 horas luego de la inoculación. Se observa una estructura perteneciente a la zoospora (Z) invasiva y transparente. También se puede apreciar una pequeña hifa miceliar (H) de color azul, brotando del estoma (E) invadido.**

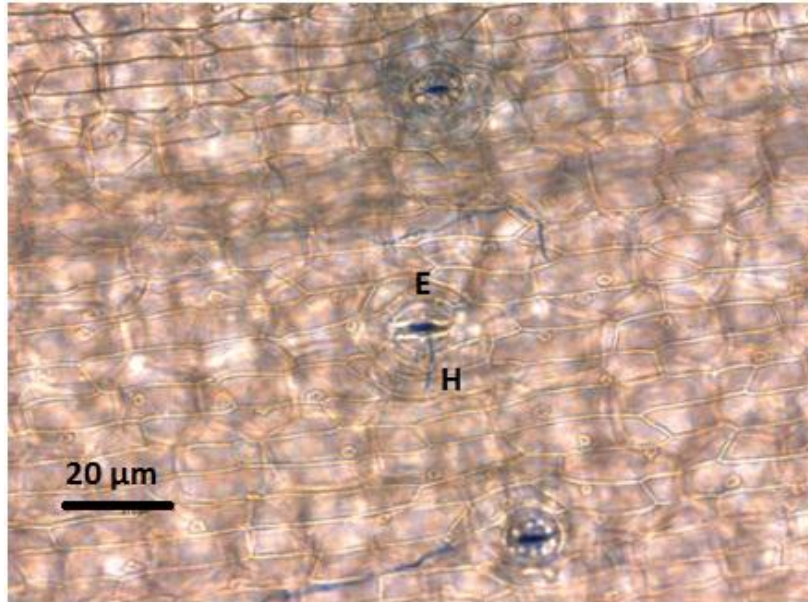


**Figura 17. Ortet 57. 12 horas luego de la inoculación. Se observa una hifa (H) micelilar de color azul, brotando de los estomas (E) invadidos.**

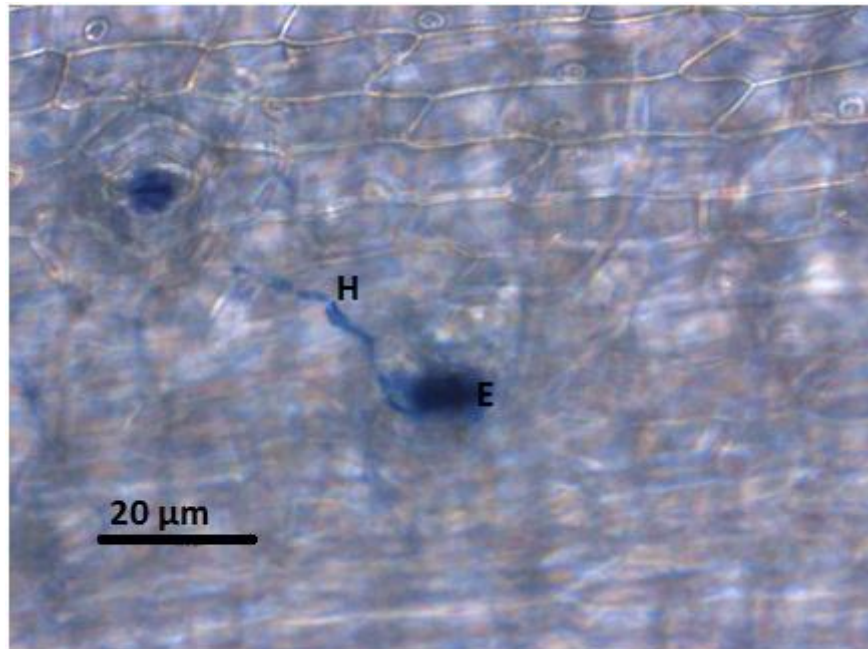


Después de transcurridas 24 horas de la inoculación, se pueden apreciar hifas en desarrollo brotando de los estomas invadidos. Para este tiempo evaluado, las diferencias básicas entre los ortets se aprecian en el desarrollo de las hifas miceliales sobre el tejido. Por ejemplo en el ortet 34 (Figura 18), las hifas son cortas y menos desarrolladas con respecto a la misma estructura observada en el ortet 57 (Figura 19).

**Figura 18. Ortet 34. 24 horas después de la inoculación. Se aprecian estomas (E) invadidos y con hifas (H) miceliares brotando de dicha estructura.**

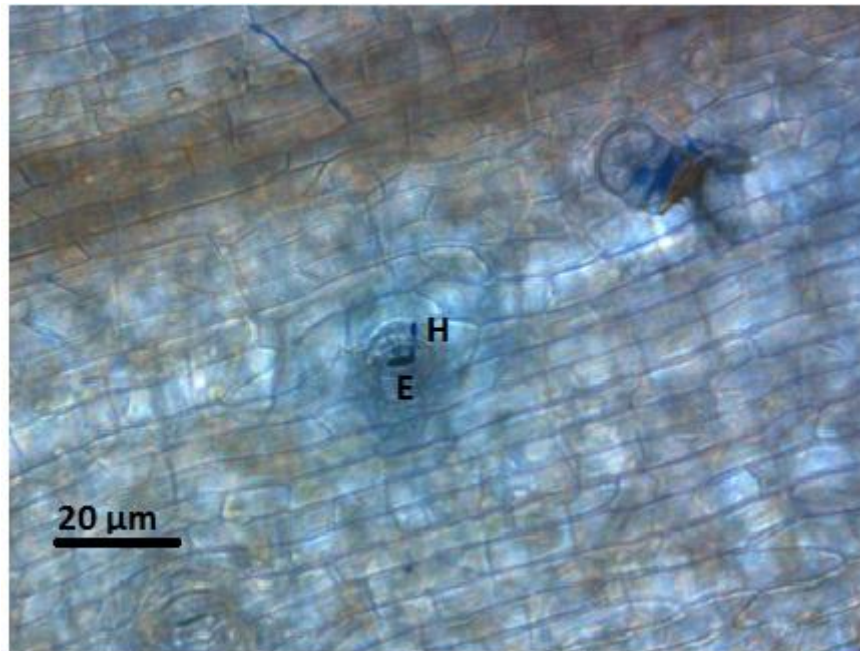


**Figura 19. Ortet 57. 24 horas después de la inoculación. Se puede observar un estoma fuertemente teñido de azul debido al estado avanzado de la hifa miceliana que además se puede apreciar mucho mas larga que en el ortet 34.**

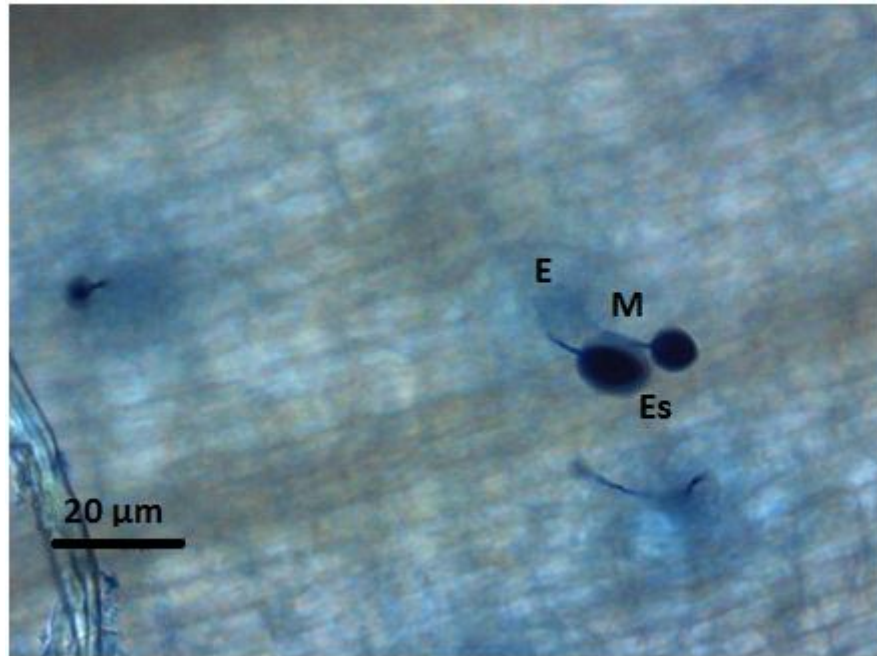


Cuando han transcurrido 48 horas luego de la inoculación se puede observar diferencias en el desarrollo de *P. palmivora*. En dicho tiempo se aprecia que en el ortet 34 (Figura 20) las hifas miceliales se desarrollan alargadas y delgadas. En cambio para el ortet 57 (Figura 21) se pueden observar hifas miceliales bien desarrolladas y con esporangios maduros en dicho tiempo.

**Figura 20. Ortet 34. 48 horas después de la inoculación. Se observa un estoma invadido con hifa miceliar saliendo del mismo y con coloración azul en una parte además de transparente en la parte mas alargada.**



**Figura 21. Ortet 57. 48 horas después de la inoculación. Se puede observar tenuemente un estoma (E) y micelio (M) saliendo del mismo. También se puede apreciar esporangios (Es) en maduración al final de las hebras de micelio.**

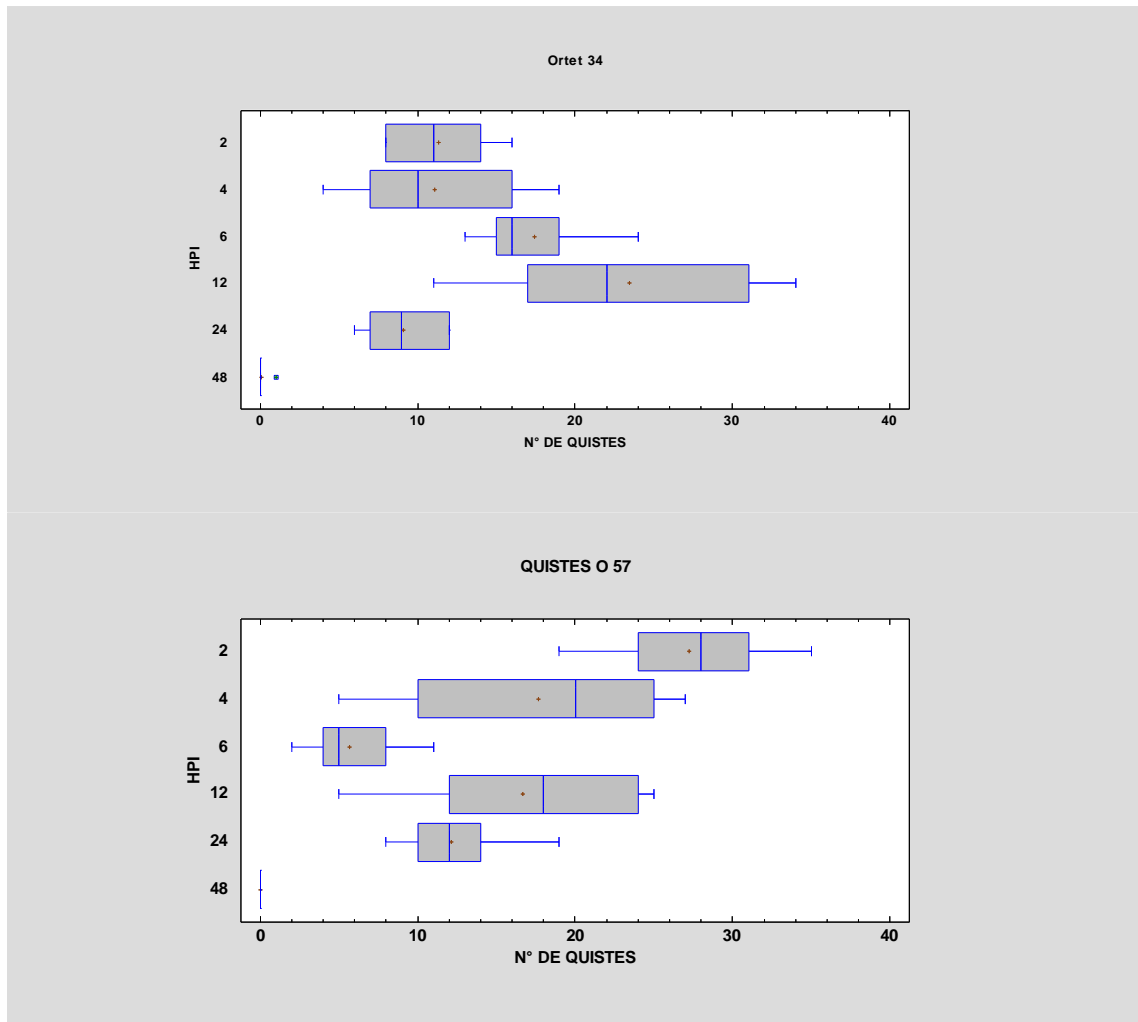


#### **4.2. CONTEO DE ESTRUCTURAS POR ORTET**

Se hicieron conteos de las tres estructuras de ataque principales tales como el quiste, apresorio y haustorio; en los diferentes tiempos evaluados. Los dos ortets evaluados presentaron diferencias en el comportamiento entre los mismos y en cada estructura.

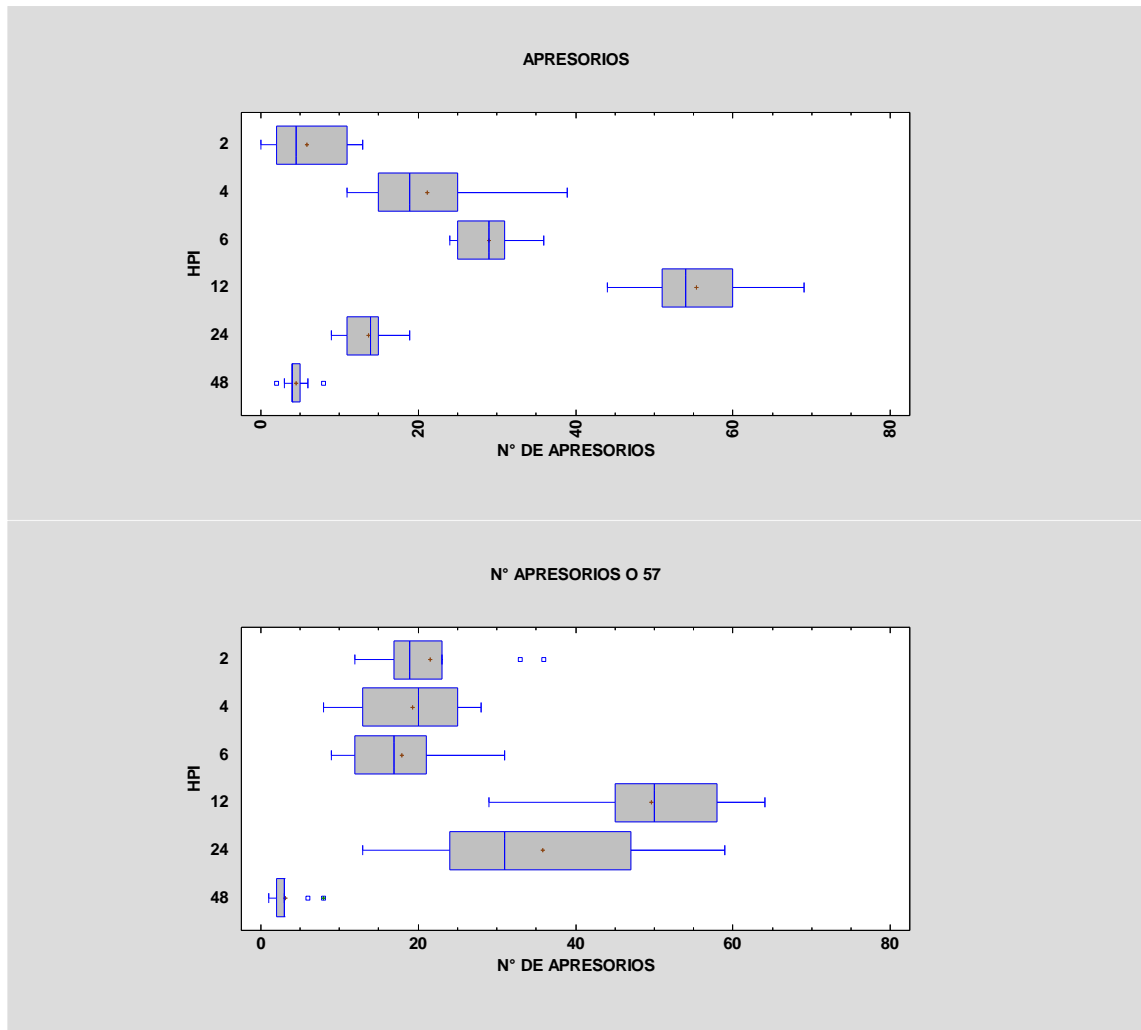
Se puede observar que el número de quistes es mucho mayor en el Ortet 57 y se presentan en su mayoría a las dos horas. Mientras que para el Ortet 34 la mayoría de los quistes se presentan a las 12 horas y con mayor dispersión en el conteo (Figura 22).

**Figura 22. Conteo de quistes para el Ortet 34 (arriba) y para el Ortet 57 (abajo). HPI: Horas Posteriores a la Inoculación**



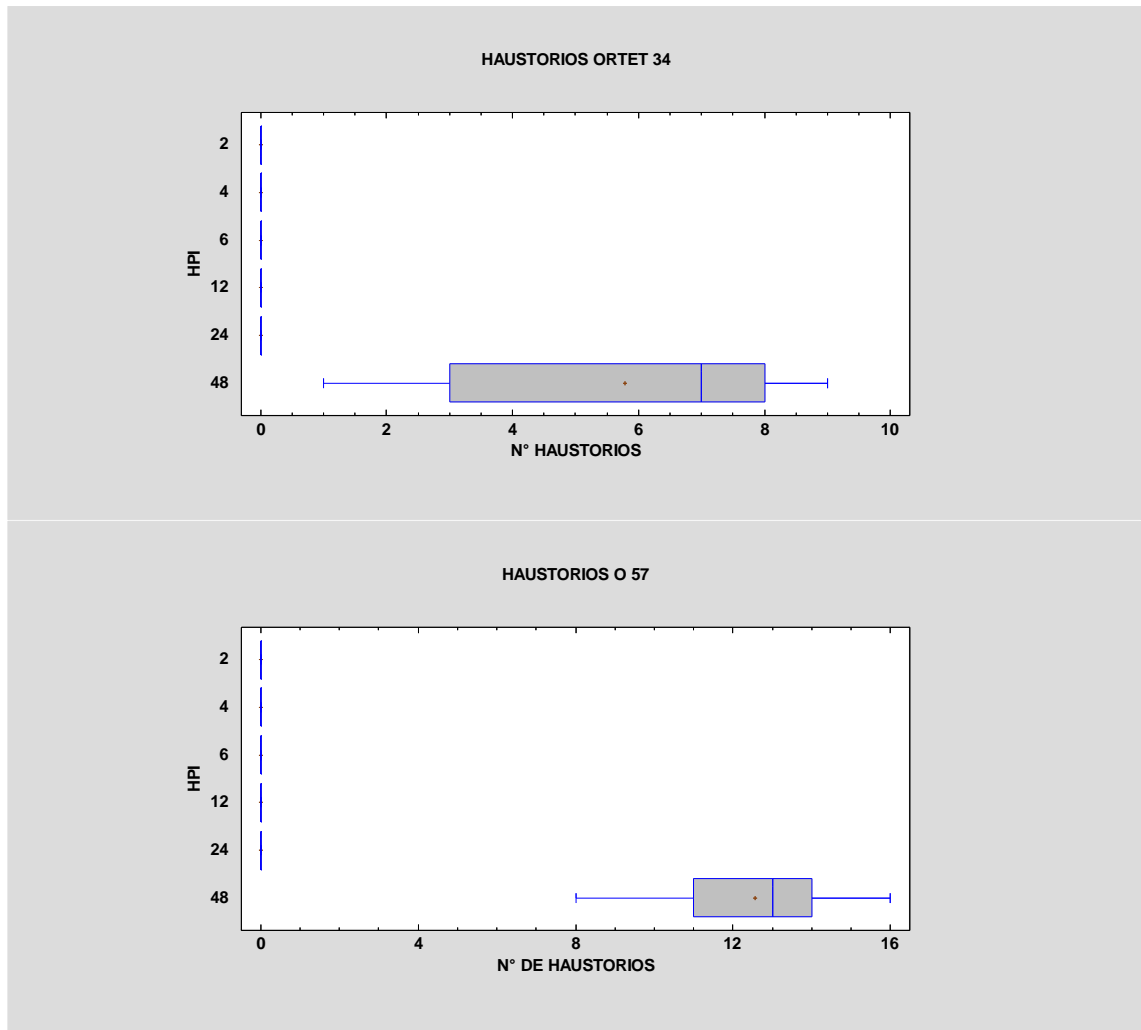
Se puede apreciar una mayor concentración de apresorios en el Ortet 57 y aparecen en mayor concentración a las 6 horas; dicha estructura aparece mayormente representada en el Ortet 34 a las 24 horas. También el número de apresorios se van reduciendo después de los tiempos anteriormente mencionados en ambos Ortets (Figura 23).

**Figura 23. Conteo de apresorios para el Ortet 34 (arriba) y para el Ortet 57 (abajo). HPI: Horas Posteriores a la Inoculación.**



Se observa que el Ortet 57 presenta la mayor concentración de haustorios en comparación con el Ortet 34. Para el Ortet 57 se pueden llegar a observar hasta 16 haustorios en un conteo mientras que en el Ortet 34 se observan un máximo de 9. Todos los haustorios fueron contados en los dos Ortets a las 48 horas (HPI) después de la inoculación (Figura 24).

**Figura 24. Conteo de haustorios en el Ortet 34 (arriba) y en el Ortet 57 (abajo).**

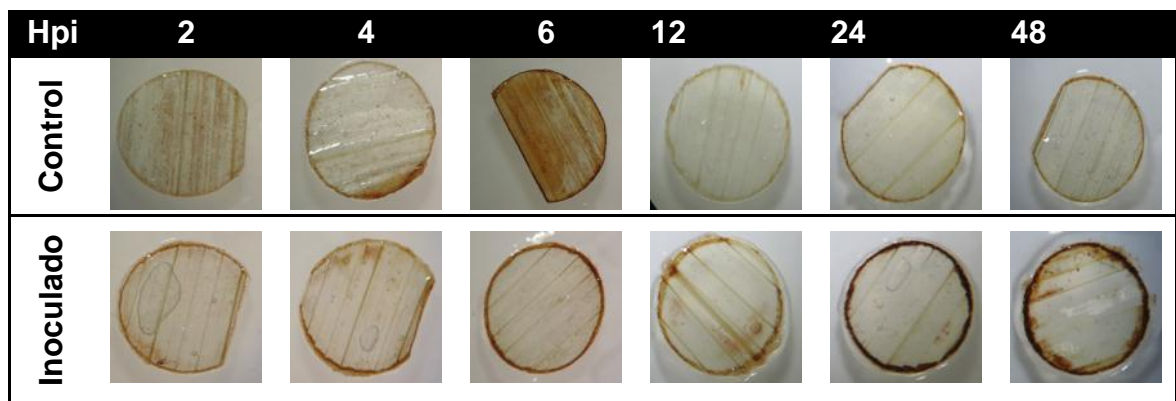


#### **4.3. DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO MEDIANTE PRUEBA DAB.**

La prueba para detección de peróxido de hidrogeno mediante 3,3'-diaminobenzidina, mostró coloración fuerte a partir de los primeros tiempos. A pesar de que los controles también presentaron coloración, estos se pueden diferenciar de los inoculados por el tono de la coloración. Para esta prueba, se presentan los resultados de los ortets 34 y 57 por ser los mas contrastantes.

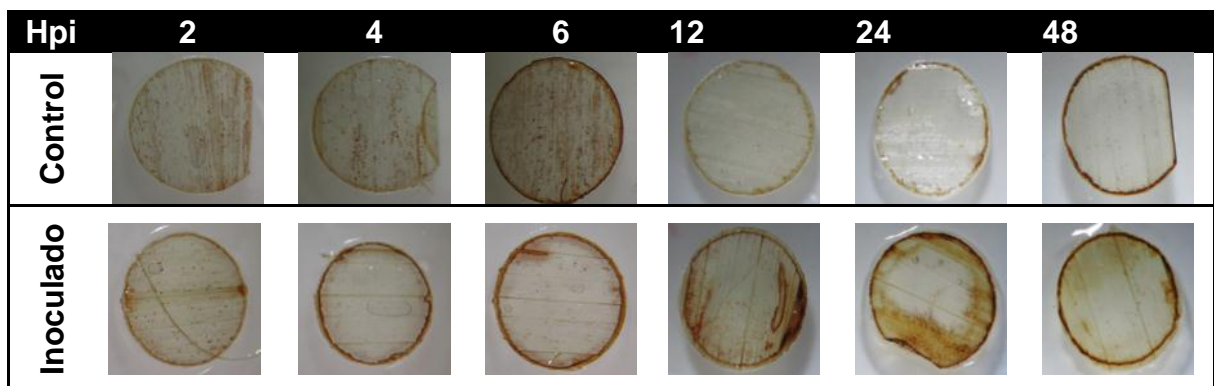
Para el ortet 34 se presentó aumento en la coloración con respecto al control a partir de las 12 horas después de la inoculación. Aunque desde el inicio de la prueba se presentaron coloraciones diferenciales entre el control y el inoculado; es mas notoria la diferencia a partir de las 12 horas (Figura 25).

**Figura 25. Ortet 34. Prueba DAB. Discos teñidos para los seis (6) tiempos evaluados con sus respectivos controles.**



Para el ortet 57, se puede observar que la coloración no aparece continua sino que presenta con una tenue coloración en los primeros tres tiempos y con una coloración fuerte en los tres últimos tiempos de inoculación. También se pueden apreciar diferencias claras entre los controles y los inoculados (Figura 26).

**Figura 26. Ortet 57. Prueba DAB. Discos teñidos para los seis (6) tiempos evaluados con sus respectivos controles.**

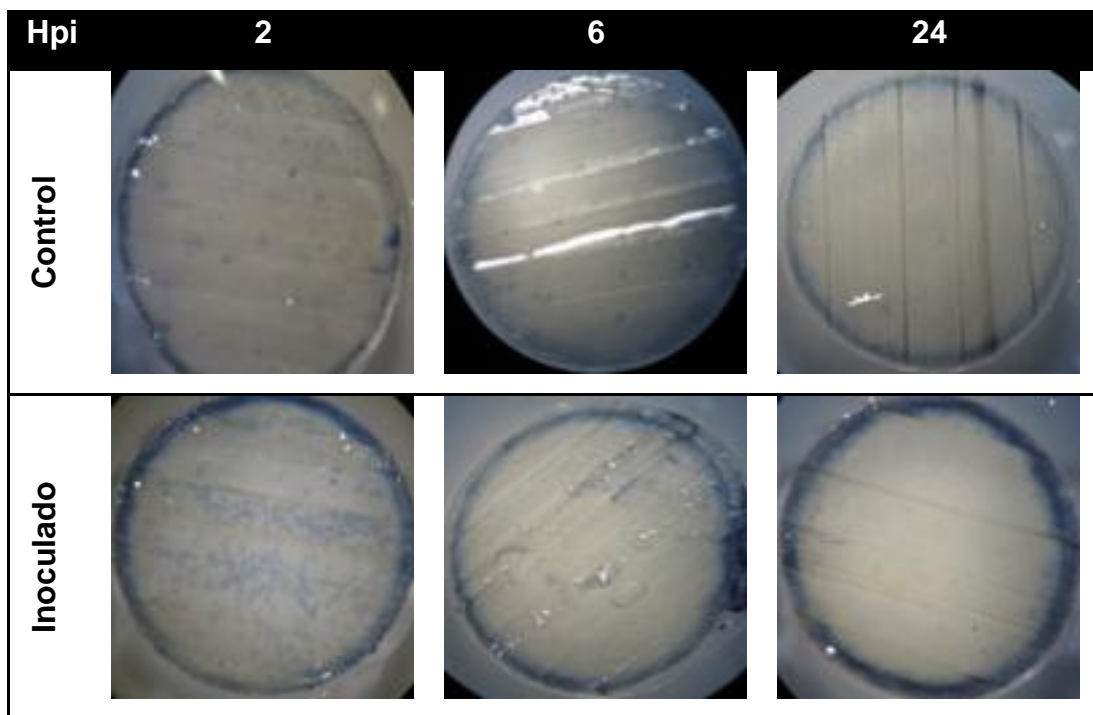


#### 4.4. DETECCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO MEDIANTE NITROBLUE TETRAZOLIUM.

En esta prueba se tomaron solo tres tiempos ya que por el tipo de prueba y el material vegetal disponible no fue posible aumentar los tiempos. Si se tiene en cuenta que el anión superóxido es un elemento que se produce de manera rápida y su acción también es de poca duración, no es viable extender la prueba a más de tres tiempos.

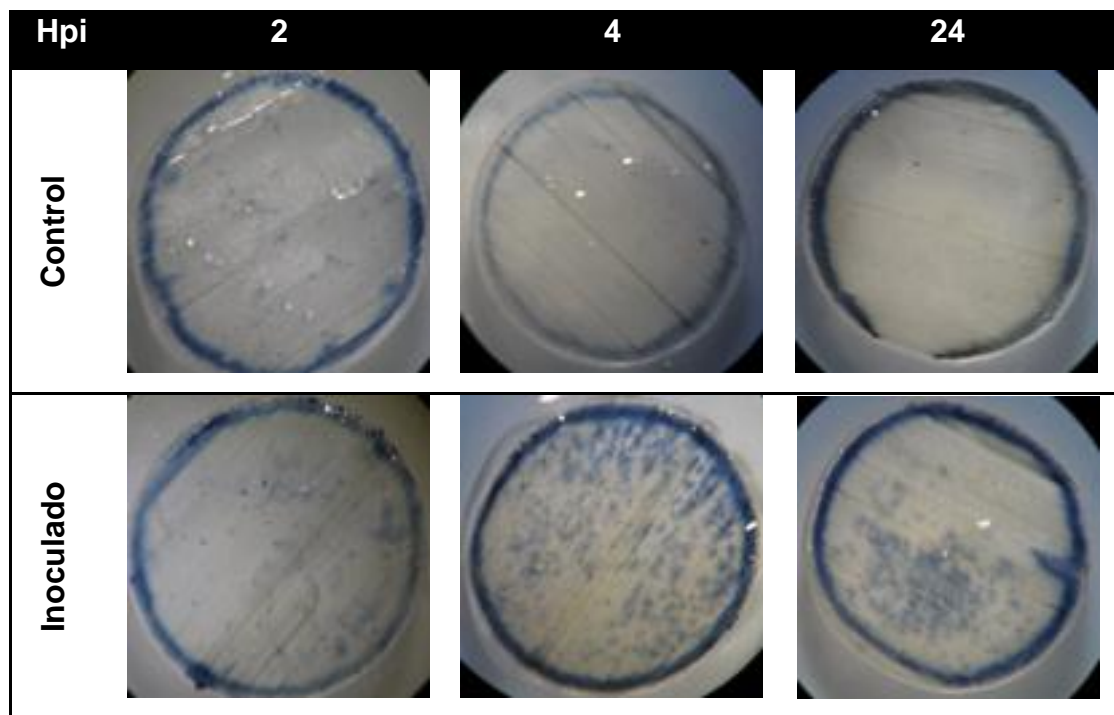
Para la prueba realizada con el ortet 34 se observó un patrón de coloración alto en las 2 y 4 primeras horas de inoculación. Así como un descenso en la coloración en horas posteriores. Además de esto aunque los controles presentaron coloración; esta fue mucho más tenue que en los discos inoculados (Figura 27).

**Figura 27. Ortet 34. Prueba NBT. Discos inoculados y teñidos para los tres tiempos evaluados para la presente prueba y con respectivo control.**



Para el ortet 57 en la presente prueba, aparece una coloración ténue en las primeras dos horas. La coloración se acentúa con el pasar del tiempo, presentándose muy azul a las 24 horas de inoculación. Además que en el respectivo control no se presenta esta coloración tan fuerte, observándose una coloración casi nula a las 24 horas de inoculación (Figura 28).

**Figura 28. Ortet 57. Discos inoculados y teñidos para los tres tiempos evaluados para la presente prueba y con respectivo control.**



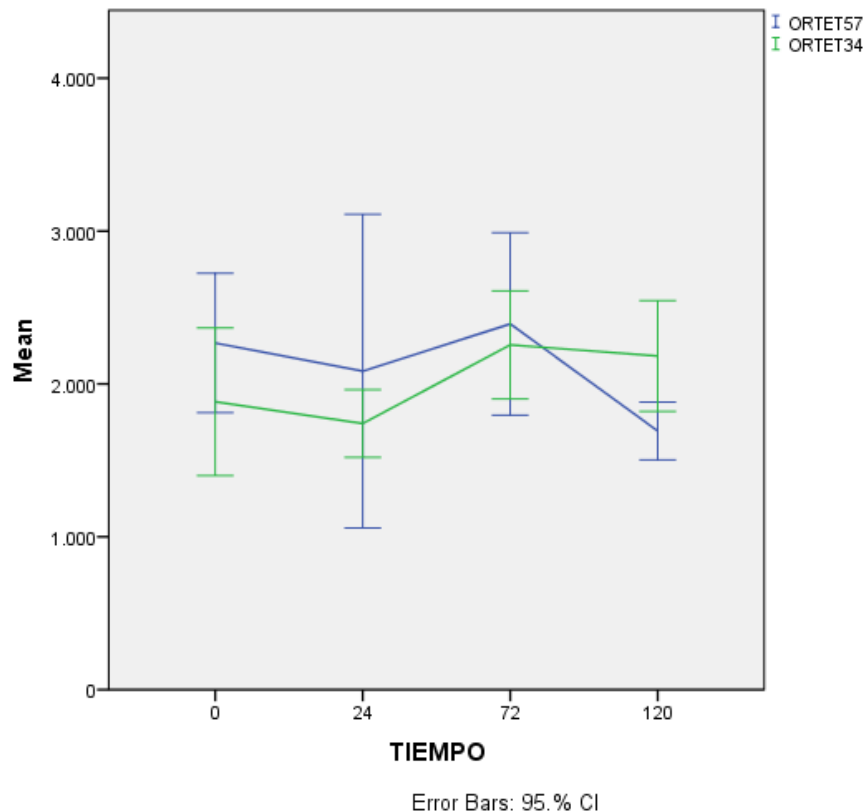
#### 4.5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

**4.5.1. Catalasa** A los datos obtenidos se les realizó una ANOVA simple donde; para el Ortet 57 el F fue de 1,151 y la significancia de 0,345. En el caso del Ortet 34 el F fue de 2,876 y la significancia de 0,053.

Posteriormente se realizó el test de Duncan en el Ortet 57. Los valores alfa ( $\alpha$ ) ajustados a  $P < 0,005$  para el tiempo 0 fue de 2267,75; para el tiempo de 24 horas fue de 2083,53; para el tiempo de 72 horas fue de 2392,77; y para el tiempo de 120 horas fue de 1691,88. El valor de significancia estadística fue de 0,138.

Se realizó también el test de Duncan en el Ortet 34. Los valores alfa ajustados a  $P < 0,005$  para el tiempo 0 fue de 1883,33; para el tiempo de 24 horas fue de 1741,38; para las 72 horas fue de 2255,49; para las 120 horas fue de 2183,54. El valor de la significancia estadística fue de 0,057.

**Figura 29. Comportamiento de la actividad de la enzima caltalsa en los dos Ortets evaluados.**



El comportamiento a través del tiempo de la actividad catalasa es variable para el Ortet 57; Como se puede observar en la Figura 29, mediante la cual se puede observar alta dispersión en los datos a través de las barras de error.

A pesar de que en el Ortet 34 se comportan los datos con alta dispersión, estos son mas estables y la media de los datos se comportan de forma creciente a través del tiempo.

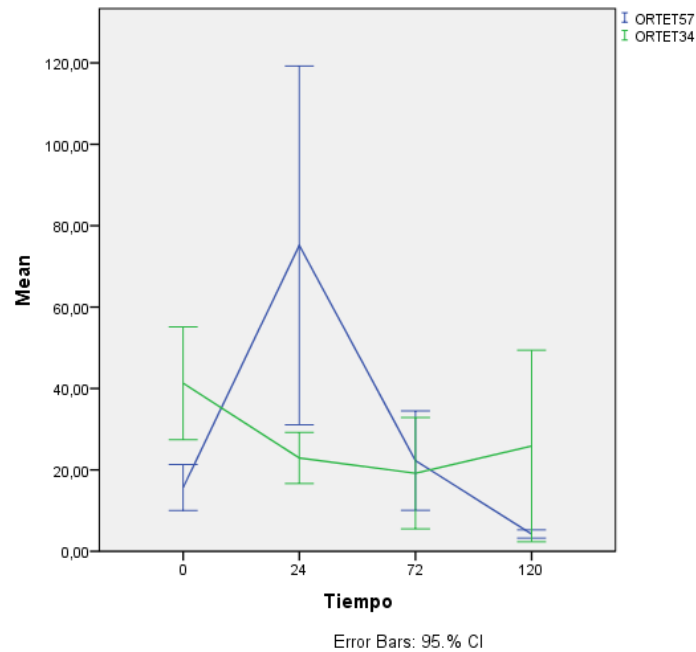
**4.5.2. Peroxidasa** A los datos obtenidos de la actividad enzimática peroxidasa se le realizó la prueba ANOVA simple; para el Ortet 57 se obtuvo el valor F de 8,851 y la significancia estadística de 0,0. Para el Ortet 34 se obtuvo el valor F de 1,611 y la significancia estadística de 0,208.

Posteriormente se realizó el test de Duncan en el Ortet 57. Los valores alfa ( $\alpha$ ) ajustados a  $P < 0,005$  para el tiempo 0 fue de 15,68; para el tiempo de 24 horas fue de 75,1667; para el tiempo de 72 horas fue de 22,2778; y para el tiempo de 120 horas fue de 4,2444. El valor de significancia estadística fue de 0,287

Se realizó también el test de Duncan en el Ortet 34. Los valores alfa ajustados a  $P < 0,005$  para el tiempo 0 fue de 41,2883; para el tiempo de 24 horas fue de 22,9333; para las 72 horas fue de 19,1778; para las 120 horas fue de 25,8778. El valor de la significancia estadística fue de 0,531.

Se puede observar mediante la Figura 30 que para los datos para los dos Ortets evaluados en el tiempo 0 la dispersión es baja; pero la misma aumenta a medida que transcurre el tiempo de inoculación. Para el Ortet 57 se aprecia un comportamiento irregular a través del tiempo, creciendo abruptamente a las 24 horas y decrece en los demás tiempos también abruptamente. En cambio para el Ortet 34 la peroxidasa inicia con una actividad alta y posteriormente decrece levemente y se mantiene estable en los demás tiempos evaluados.

**Figura 30. Comportamiento de la actividad enzimática peroxidasa en los Ortets evaluados.**



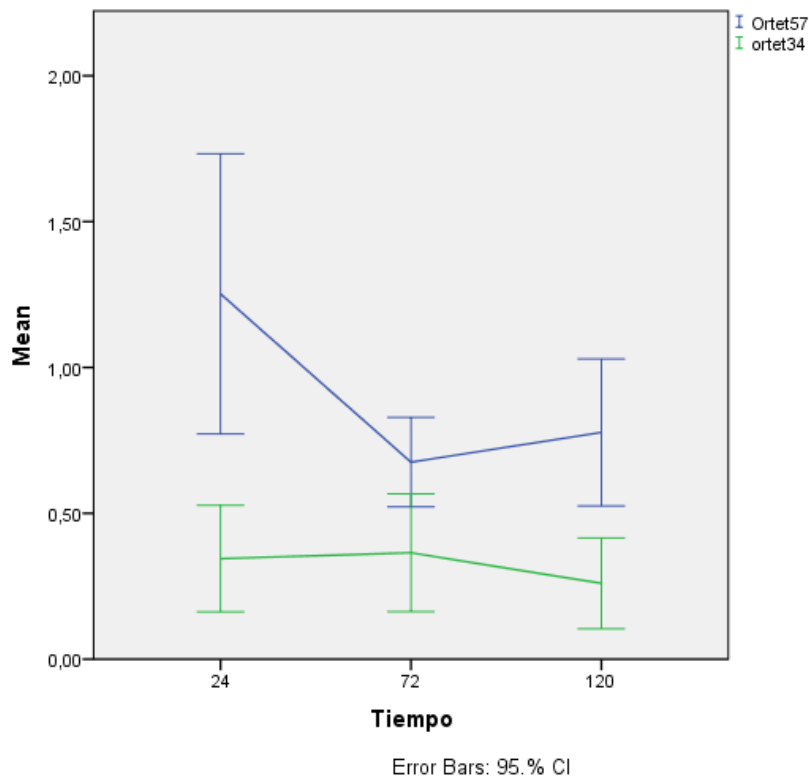
**4.5.3. Fenilamonió-Liasa (PAL)** Al grupo de datos obtenidos para los Ortets evaluados se les realizó la prueba ANOVA simple. Para el Ortet 57 se obtuvo un F de 15,996 y una significancia de 0. Para el Ortet 34 se obtuvo un F de 0,631 y una significancia de 0,548.

Se realizó el test de Duncan en el Ortet 57. Los valores alfa ( $\alpha$ ) ajustados a  $P < 0,005$ . Para el tiempo de 24 horas fue de 1,4643; para el tiempo de 72 horas fue de 0,6074; y para el tiempo de 120 horas fue de 0,7993. El valor de significancia estadística fue de 0,241.

Se realizó también el test de Duncan en el Ortet 34. Los valores alfa ajustados a  $P < 0,005$  para el tiempo de 24 horas fue de 0,3447; para las 72 horas fue de 0,3648; para las 120 horas fue de 0,2601. El valor de la significancia estadística fue de 0,332.

Se puede observar mediante la Figura 31 que la producción de la enzima fenilamonioliasa en el Ortet 57 presenta una gran producción a las 24 horas y posteriormente desciende abruptamente. Por el contrario para el Ortet 34 se presenta una producción moderada y se mantiene a las 72 horas después de la inoculación. Posterior a esto la fenilamonioliasa (PAL), en el Ortet 34 tiende a descender a las 120 horas después de la inoculación.

**Figura 31. Comportamiento de la actividad enzimática Fenilamonioliasa (PAL) en los tiempos evaluados.**



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS Y CONTEO DE ESTRUCTURAS

Por medio de los anteriores resultados se puede describir a *P. palmivora* como un oomiceto típico, ya que presenta el mismo tipo de estructuras que los demás miembros del grupo. Observando la interacción con la palma de aceite (*E. guineensis*) se aprecia un retardo en la presencia de ciertas estructuras con respecto a otros oomicetos con tiempos de infección y avance ya reportados (Grenville et al., 2005).

En los tiempos iniciales del ataque, el oomiceto busca las zonas de más fácil ataque. Una de las estructuras naturales que permiten el avance de la infección son los estomas (Hardham, 2007). Sobre las células acompañantes se posan las zoosporas enquistadas y permean el estoma por medio del túbulo germinativo. Según Judelson y Blanco (2005), durante las 4 horas siguientes posteriores a la invasión se produce el establecimiento del oomiceto y produce estructuras que permiten la fijación a los tejidos.

Según la publicación de Sarria et al. (2015) en tejido vegetal de palma adulta, las zoosporas de *P. palmivora* son atraídas hacia estructuras como tricomas y estomas para iniciar el proceso de infección. Estos resultados estarían de acuerdo a los resultados presentados, con la diferencia de que en los clones in vitro utilizados para este estudio no se identificaron los tricomas y si se observó microscópicamente que el proceso de infección y colonización prevaleció en los estomas. En el estudio del proceso de infección de *P. palmivora* en Durian (*Durio zibethinus L.*), se encontró que el patógeno prefiere las heridas naturales para entrar utilizando como puerta de entrada los tricomas y estomas, para posterior

desarrollo de las hifas, siendo posible detectar la infección a las 48 horas (O’Gara et al. 2004). En el estudio del avance de la infección por *P. capsici* en pimentones adultos (*Capsicum sp*) por Du et al. (2013), se encontró que los estomas son estructuras que permiten la salida del micelio para recomenzar un nuevo ciclo de infección, además de las venas de la hojas y el proceso de ruptura de epidermis.

Acorde a lo presentado por Latijnhouwers, et al, (2003), quien explica el modo de colonización de los oomicetos, se pueden encontrar diferencias en el mecanismo de infección en tiempos tempranos post inoculación. Lo anterior, como se apreció para los Ortets 34 y 57 y la cantidad de quistes de este último, a las dos (2) horas post inoculación.

En estudios de interacción compatible entre *P. capsici* y *Arabidopsis* (Wang et al., 2013), se registró que la formación de estructuras como apresorios, seguidos por hifas, austerios y esporangios definen la invasión del tejido vegetal en tiempos no superiores a las seis (6) horas. En otro estudio, con un patógeno biotrófico como *Blumeria graminis* (Yamaoka et al., 2007) los túbulos germinativos primarios se evidencia a las dos (2) horas del proceso de infección y marcan la susceptibilidad de la especie vegetal.

En este estudio, las diferencias en avance de la infección se detectaron tempranamente a las 2 horas post inoculación, ya que en el Ortet 57 se detectaron mayor número de quistes y apresorios (Figuras 22 y 23). Estos resultados son diferentes a aquellos observados durante el proceso de infección de *P. capsici* en pimentones adultos (*Capsicum sp*) por Du et al. (2013). En ese estudio se concluye que hasta las 12 horas post inoculación las variedades resistentes y susceptibles presentaron síntomas bastantes similares, lo anterior con base en el desarrollo de quistes y túbulos germinativos. Las diferencias más significativas aparecieron a las 72 horas, en las cuales la variedad susceptible mostró un

desarrollo de micelio mayor y de ahí en adelante, se evidenciaron todos los síntomas asociados al ataque del patógeno.

En lo referente a tiempos largos post inoculación, para las 12 horas posteriores a la inoculación se puede apreciar formaciones miceliales brotando de la zona de infección. Dichas formaciones confirman el progreso de la infección (Kamoun et al, 1999). En el Ortet resistente (Ortet 34) se observa que aún la zoospora no ha terminado su fase en el ciclo infectivo. Las diferencias en el avance de la infección confirman la teoría del anfitrión y no anfitrión (Kogel et al., 2006; Lebeda,et al., 2008; Stössel, et al, 1980).

Para las observaciones de las 48 horas posteriores a la inoculación se puede observar que en el caso del Ortet 57, el desarrollo de la infección es mucho más rápido. Dicho desarrollo prospera a tal punto que en el Ortet 57 se observan esporangios en desarrollo. Por el contrario en el Ortet 34 se observa en el mismo tiempo unas hifas poco desarrolladas y sin capacidad de avanzar más en el proceso de infección. La estructura característica de este tiempo es el haustorio; presentándose con un alto número en el Ortet 57 y con uno bajo en el Ortet 34.

En cuanto a los tiempos de infección, Sarria et al, (2015) encontró que para *P. palmivora* y *E. guineensis*, un nuevo ciclo comienza entre las 36 y las 48 horas post-inoculación, proceso evidenciado por la observación de esporangios y clamidiosporas. Para el caso de estudio, en el ortet 57 se observaron esporangios a las 48 horas post-inoculación, indicando la tendencia susceptible de este material frente a *P. palmivora*.

Lo anterior confirma que el proceso de desarrollo de la infección sigue el modelo de Anfitrión y No Anfitrión. En el caso de la infección de *P. palmivora* a la palma de aceite, el Anfitrión es el Ortet 57 y el No Anfitrión es el Ortet 34. Todo esto se puede afirmar, dado las observaciones con múltiples evidencias de dicho hecho y

confirma lo propuesto a lo largo de múltiples estudios acerca de la relación planta-patógeno (Stössel, et al, 1980).

## **5.2. PRUEBA DAB Y NBT**

Los resultados contrastantes entre los Ortets 34 y 53, son afines con la teoría del Anfitrión, donde se observa poca reacción con DAB en las primeras etapas de la interacción entre la planta y el patógeno (Wang et al., 2010). Lo anterior seguido de una fuerte reacción en los tiempos más tardíos; esta reacción con peróxido de hidrogeno ya hace parte de la Muerte Celular Programada (PCD) (Uma y Podile, 2015).

Por la reacción del Ortet 34 (coloración más intensa en los primeros 3 tiempos se puede hipotetizar la teoría del No Anfitrión, la cual expresa que la planta reacciona al ataque del patógeno liberando peróxido de hidrogeno en forma sostenida. Esta reacción hace parte de la Respuesta Primaria a Patógenos (Zhang et al., 2011).

Para la prueba NBT, donde se buscaba el indicio de la respuesta oxidativa de la planta o respuesta primaria (Trujillo et al., 2004; Wang et al., 2007), se definió que el Ortet 34, se presenta una reacción positiva en los primeros tiempos (2 y 6 horas) y una baja reacción en el tiempo posterior (24 horas), contrario al Ortet 57. En el caso de cepas vegetales resistentes, la explosión oxidativa es de moderada a alta en los primeros tiempos de exposición al patógeno y en tiempos tardíos se observa una muy leve señal oxidativa (Shetty, et al, 2008b; Uma y Podile, 2015; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2012).

En el caso del Ortet 57 se presenta una baja coloración, esto puede deberse a lo expresado por Hao et al (2011) donde describe el proceso de reacción contra patógenos como una reacción ascendente. Dicha reacción no se comporta de esta

manera en las cepas no resistentes; en las cuales la reacción es muy débil al inicio. Posteriormente la coloración aumenta a las 6 horas de manera abrupta comparada con su contraparte resistente y a su vez a las 12 horas de la inoculación se presenta con una coloración muy fuerte (Flemmer et al., 2010; Ge, et al., 2013).

Según la teoría del Anfitrión y No Anfitrión propuesta para este tipo de patosistemas; la explosión oxidativa en las cepas vegetales No Anfitrionas se presenta como respuesta no de defensa sino de muerte celular pero tardíamente (Shetty et al., 2008a). De esta manera y como se ha concebido la teoría anteriormente referenciada, las moléculas de respuesta primaria generan Muerte Celular Programada (PCD). Pero la protección a la planta se da dependiendo de la etapa de la infección en la cual se encuentre el tejido reaccionante (Southerton, et al., 1990).

### **5.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

**5.3.1. Catalasa** Para el Ortet 57 se evidencia que a pesar de su inicio alto tiende a decaer dicha actividad a las 120 horas. Teniendo en cuenta la teoría del Anfitrión y No Anfitrión; el Ortet 57 se comporta como anfitrión; ya que en la fase de proliferación del patógeno, la actividad catalasa decae (Romero et al., 2008).

Por lo contrario en el caso del Ortet 34, a pesar que la actividad comienza más baja que en su contraparte, tiende a comportarse de forma creciente a través del tiempo. Para el Ortet 34 se puede notar que en el caso de la enzima catalasa, se observa actividad creciente en el tiempo crítico del ataque del patógeno y concuerda con lo propuesto por Borden y Higgins, 2002 para la actividad enzimática catalasa en grupos resistentes o No Anfitriones.

**5.3.2. Peroxidasa** Para el Ortet 57, la enzima peroxidasa se detecta en menor proporción que en el Ortet 34 al inicio de la prueba. Siendo el Ortet 57 susceptible presenta una baja concentración de la enzima (Silva, et al., 2008). Luego de las 24 horas se aprecia un incremento en la actividad peroxidasa en en Ortet 57; para luego decaer abruptamente y llegar hasta casi 0 a las 120 horas: Este comportamiento se puede atribuir a una reacción de muerte celular por ataque de patógenos o PCD propuesta por Silva, et al., (2002).

Para el caso de la contraparte, el Ortet 34 el cual es resistente al ataque de *P. palmivora*, la actividad peroxidasa inicia alta. Por el contrario del Ortet 57, en el Ortet 34, la actividad peroxidasa decae pero se mantiene estable a las 72 horas y presenta un leve incremento de actividad a las 120 horas. La tendencia general para el Ortet 34 es de una producción estable de dicha enzima. Lo anterior tendiente a la protección de las células frente al ataque del patógeno (Shetty et al., 2008a; Shlezinger et al., 2011).

Dicha enzima hace parte del primer tipo de reacción ante patógenos; el cual consiste en producir sustancias que protejan la célula atacada o en su defecto que la lleven a apoptosis celular (Romero et al., 2008).

**5.3.3. Fenilamonio-Liasa (PAL)** Para el Ortet 57 se observa una actividad enzimática alta aunque variable y con mucha dispersión entre las muestras. En el periodo de 24 horas después de la inoculación es cuando presenta la actividad más alta. La actividad enzimática decae en el periodo de las 72 horas y presenta un leve incremento a las 120 horas. Este comportamiento es reportado por Ardila, et al., 2007 y Silva et al., 2002; el cual es atribuido a la aparición de fenoles y demás sustancias que ayudan a proteger los tejidos vegetales del ataque patogénico e intervienen en la detección de la actividad enzimática.

Para el caso del Ortet 34, el cual presenta resistencia al patógeno *P. palmivora*, el comportamiento de la actividad enzimática se presenta aunque baja relativamente estable a través del tiempo y se presenta relativamente uniforme la actividad entre las diferentes muestras evaluadas. Este comportamiento de la enzima PAL es reportado por Silva et al., (2002); en plantas resistentes de café. Dicho comportamiento genera protección por la presencia constante del ácido cinámico en los tejidos vegetales (Lebeda et al., 2008).

## 6. CONCLUSIONES

\* La metodología de disco propuesta por Asselbergh et al., (2007) para detección de la interacción planta-patógeno en tomate; también funciona para el seguimiento microscópico de la infección de *P. palmivora* en palma de aceite. Se logró detectar microscópicamente la interacción del oomiceto en 6 tiempos de infección diferentes.

\* En los tiempos de infección estudiados se pudieron observar las estructuras típicas del oomiceto *P. palmivora* como: túbulo germinativo, el apresorio, la hifa infectiva y el haustorio.

\* Con este estudio, el seguimiento histológico del proceso de infección permitió determinar que los tiempos tempranos son determinantes en el proceso de resistencia/susceptibilidad del material vegetal bajo estudio.

\* La infección de *P. palmivora* en la palma de aceite con cierto grado de resistencia genera reacciones de defensa primarias tales como: la producción de peróxido de hidrógeno y anión superóxido.

\* La producción de moléculas de defensa primaria son diferenciales entre los Ortets 34 y 57. Dichas moléculas se observaron en producción sostenida y creciente en el Ortet 34 (resistente). Y producción poco apreciable en los primeros tiempos y descarga abrupta de las mismas en los tiempos tardíos, esto en el Ortet 57 (susceptible).

\* La actividad enzimática Fenilamonioliasa fue la de mejor comportamiento para los tiempos evaluados; ya que se observaron inicialmente diferencias

considerables entre los dos Ortets. Aunque con el tiempo tienden a acercarse en el comportamiento; los dos Ortets mantienen claras diferencias.

## BIBLIOGRAFÍA

ADAM, H., JOUANNIC, S., ESCOUTE, J., DUVAL, Y., VERDEIL, J. L., & TREGEAR, J. W. Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*, Arecaceae). *American Journal of Botany*, 92(11), 2005 1836–1852.

ALVARADO, A., ESCOBAR, R., & HENRY, J. (). El híbrido OxG Amazon : una alternativa para regiones afectadas por Pudrición del cogollo en palma de aceite. *Palmas*, 34, 2013 305–314.

ARANGO, M., OSPINA, C., SIERRA, J., & MARTINEZ, G. *Mindus crudus*: vector del agente causante de la Marchitez letal en palma de aceite.pdf. 2011

ARDILA, H., BAQUERO, B., & MARTINEZ, S. Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp *Dianthi* raza 2. *Revista Colombiana de Química*, 36(2), 151–167. 2007

ARIAS, N., BELTRÁN, J. A., GUERRERO, J. M., & SÁNCHEZ, A. C. Tecnologías para el manejo de la Pudrición del cogollo ( PC ) de Technologies for Bud Rot Treatment in Oil Palm Validated in Colombian Palm Zones, 35(2), 39–52. 2014

ArONDEL, V., NGADO-EBONGUE, G. F., AJAMBANG, W. N., KOONA, P., & LALU, B. *Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 1.* (S. K. Gupta, Ed.) (Vol. 1). New York, NY: Springer New York. 2012

ASSELBERGH, B., CURVERS, K., FRANCA, S. C., AUDENAERT, K., VUYLSTEKE, M., VAN BREUSEGEM, F., & HÖFTE, M. (). Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology*, 144(4), 1863–1877. 2007

ATTARD, A., GOURGUES, M., GALIANA, E., PANABIÈRES, F., PONCHET, M., & KELLER, H. (). Strategies of attack and defense in plant–oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 83–94. 2008

BASIRON, Y. Palm Oil and Its Global Supply and Demand Prospects. *Oil Palm Industry Economic Journal*, 2(1), 1–10. 1999

BASIRON, Y. Palm oil production through sustainable plantations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(4), 289–295. 2007

BEAKES, G. W., GLOCKLING, S. L., & SEKIMOTO, S. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi.” *Protoplasma*, 249(1), 3–19. 2012

BEIRNAERT, A., & VANDERWEYEN, R. Contribution à l'étude génétique et biométrique des varités d' *Elaeis guineensis* Jacq. Publications de L' Institut Nacional Pour L'étude Agronomique Du Congo Belgue, Serie Cien(27). 1941

BERNAL, N. El cultivo de palma de aceite y su beneficio. Fedepalma. 2001

BORDEN, S., & Higgins, V. J. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(4), 227–236. 2002

CEPERO, M. C., RESTREPO, S., FRANCO, A. E., CARDENAS, M., & VARGAS, N. *Biología de hongos* (Primera ed.). Bogotá: Ediciones Uniandes. 2012

COCHARD, B., ADON, B., REKIMA, S., BILLOTTE, N., DE CHENON, R. D., KOUTOU, A., ... NOYER, J. L. Geographic and genetic structure of African oil palm diversity suggests new approaches to breeding. *Tree Genetics and Genomes*, 5(3), 493–504. 2009

CORLEY, R. H. V., & TINKER, P. B. *The Oil Palm*. (R. H. V. Corley & P. B. Tinker, Eds.) (4rd editio.). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. 2003

CORREDOR, A., MARTÍNEZ, G., & SILVA, Á. Problemática de la Pudrición del cogollo en Tumaco e instrumentos para su manejo y la renovación del cultivo. *Palmas*, 29, 11–16. 2008

Daudi, A., & O'Brien, J. A. Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio- Protocol*, 2(18). 2012

DRANSFIELD, J., UHL, N. W., ASMUSSEN, C. B., BAKER, W. J., HARLEY, M., & LEWIS, C. *Genera Palmarum. The evolution and classification of palms*. (Second edi.). International Palm Society. 2008

DRENTH, A., & GUEST, D. *Phytophthora : la destructora de plantas*. *Palmas*, 34, 49–56. 2013

DRENTH, A., TORRES, G. A., & MARTÍNEZ, G. Pudrición del cogollo en la palma de aceite. *Palmas*, 34, 87–94. 2013

DU YU, GONG Z, LIU G, ZHAO Y Scanning electron microscopic study of the infection process of *Phytophthora Capsici*. *Pak J Bot* 45:1807–1811. 2013

FLEMMER, A. C., ANDERSON, F. E., HANSEN, P. V, & MCLAREN, D. A. Microscopic observations of a compatible host / pathogen interaction between a potential biocontrol agent ( *Uromyces pencanus* ) and its target weed ( *Nassella neesiana* ). *Mycoscience*, 51(5), 396–400. 2010

FRANQUEVILLE, H. La pudrición del cogollo de la palma aceitera en América Latina. Cirad. 2001

GE, Y., BI, Y., & GUEST, D. I. Defence responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81(2013), 13–21. 2013

GIRALDO, M. C., & VALENT, B. Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Publishing Group*, 11(11), 800–814. 2013

GOVAERTS, R., & DRANSFIELD, J. World Checklist of Palms. Royal Botanical Gardens, Kew. 2005

GRENVILLE-BRIGGS, L. J., & WEST, P. VAN. The Biotrophic Stages of Oomycete–Plant Interactions, 57(05), 217–243. 2005

GUERRA, A. La experiencia colombiana en el desarrollo de la palma aceitera, 7–11. 1987

GUPTA, S. K. Technological Innovations in mayor worls oil crops vol1. 2012

HAO, X., YU, K., MA, Q., SONG, X., LI, H., & WANG, M. Histochemical studies on the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hypersensitive cell death in the nonhost resistance of pepper against *Blumeria graminis* f. Sp. *Tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 104–111. 2011

HARDHAM, A. R. The cell biology behind Phytophthora pathogenicity. *Australasian Plant Pathology*, 91–98. 2001

HARDHAM, A. R. Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cellular Microbiology*, 9(1), 31–39. 2007

HÜCKELHOVEN, R., & KOGEL, K. Tissue-Specific Superoxide Generation at Interaction Sites in Resistant and Susceptible Near-Isogenic Barley Lines Attacked by the Powdery Mildew Fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *The American Phytopathological Society*, 11(4), 292–300. 1998

JUDELSON, H. S., & BLANCO, F. A. The spores of Phytophthora: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(1), 47–58. 2005

KAMOUN, S., HUITEMA, E., & VLEESHOUWERS, V. G. A. A. Resistance to oomycetes: A general role for the hypersensitive response? *Trends in Plant Science*, 4(5), 196–201. 1999

KOGEL, K.-H., FRANKEN, P., & HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 358–363. 2006

LATIJNHOUWERS, M., DE WIT, P. J. G. M., & GOVERS, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology*, 11(10), 462–469. 2003

LEBEDA, A., SEDLÁŘOVÁ, M., PETŘIVALSKÝ, M., & PROKOPOVÁ, J. Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: A case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1), 71–89. 2008

MARKS, G. C., & MITCHELL, J. E. Penetration and Infection of Alfalfa Roots by *Phytophthora-Megasperma* and Pathological Anatomy of Infected Roots. *Canadian Journal of Botany*, 49(1), 63 1971

MARTINEZ, G. Avances en la solución de la Pudrición del Cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas*. 2008

MARTÍNEZ, G. Pudrición del cogollo , Marchitez sorpresiva , Anillo rojo y Marchitez letal en la palma de aceite en América. *Palmas*, 31(1), 43–53. 2010

MARTÍNEZ, G., ARANGO, M., SARRIA, G., VELEZ, D., RODRIGUEZ, J., MESTIZO, Y., ... GUEST, D. las dos enfermedades más importantes en la palma de aceite en Colombia : *Palmas*, 34, 39–48. 2013

MEUNIER, J. Una posible solución genética para el control de la Pudrición de Cogollo en la Palma Aceitera. *Palmas*, 39–42. 1991

O'GARA E, SANGCHOTE S, FITZGERALD L, et al. Infection Biology of *Phytophthora palmivora* Butl. in *Durio zibethinus* L. (Durian) and Responses Induced by Phosphonate. In: Drenth A, Guest DI (eds) *Divers. Manag. Phytophthora Southeast Asia*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, p 42 2004

PEÑA, E., REYES, R., BASTIDAS, S., MORALES, F., & LOZANO, I. Comportamiento en vivero de las enfermedades de la mancha anular y el anillo clorótico en cruces comerciales de palma aceitera *Elaeis guinnensis* e híbridos OXG en Tumaco, Colombia. *ASD Oil Palm Papers*, 34(34), 33–45. 2010

RECH, G. E., RIVERA, L. P., BENITO, E. P., VARGAS, W. A., & DI, M. Plant Defense Mechanisms Are Activated during Biotrophic and Necrotrophic

Development of *Colletotricum graminicola* in Maize. *Plant Physiology*, 158(March), 1342–1358. 2012

ROJAS, E. A P., ORTEGA, M. C., CUESTA, R. R., & PÉREZ, S. B. Descripción de síntomas de mancha anular en el híbrido interespecífico de palma aceitera OxG ( *Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis* ) \*, 11, 48–52. 2010

ROMERO, D., RIVERA, M. E., CAZORLA, F. M., CODINA, J. C., FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D., TORÉS, J. A., DE VICENTE, A. Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement in compatible and incompatible melon-powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interactions. *Journal of Plant Physiology*, 165(18), 1895–905. 2008

ROMERO, H. M., FORERO, D. C., & HORMAZA, P. Phenological growth stages of African oil palm (*Elaeis guineensis*). *Annals of Applied Biology*, 160(1), 56–65. 2012

SAHA, D. C., JACKSON, M. A., & JOHNSON-CICALESE, J. M. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in a turf and forag grasses.pdf. *Phytopathology*, 78. 1987

SÁNCHEZ POTES, A. (). Enfermedades de la palma de aceite en America Latina. *Palmas*, 4. 1990

SARRIA GA, MARTINEZ G, VARON F, et al. Histopathological studies of the process of *Phytophthora palmivora* infection in oil palm. *Eur J Plant Pathol* 2015

SARRIA, G. A., TORRES, G. A., AYA, H. A., ARIZA, J. G., RODRIGUEZ, J., VÉLEZ, D. C, ... MARTINEZ, G. Microorganismos asociados a la la Pudrición Pudrición del cogollo de de la la Palma Palma de aceite y y su su

inoculación inoculación en en palmas palmas de de vivero vivero. *Palmas*, 29, 19–30. 2008

SARRIA, G. A., TORRES, G. A., AYA, H. A., ARIZA, J. G., RODRÍGUEZ, J., VÉLEZ, D. C., ... MARTÍNEZ, G. *Phytophthora* sp . es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo ( PC ) de la Palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 29, 31–41. 2008

SHAW, B. D., & HOCH, H. C. Ions Regulate Spore Attachment , Germination , and Fungal Growth I . Introduction. In *Biology of the Fungal Cell*, 2nd Edition. 2007

SHETTY, N. P., JENSEN, J. D., KNUDSEN, A., FINNIE, C., GESHI, N., BLENNOW, A., ... JØRGENSEN, H. J. L. Effects of  $\beta$ -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(15), 4287–4300. 2009

SHETTY, N. P., JØRGENSEN, H. J. L., JENSEN, J. D., COLLINGE, D. B., & SHETTY, H. S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3), 267–280. 2008a

SHETTY, N. P., JØRGENSEN, H. J. L., JENSEN, J. D., COLLINGE, D. B., & SHETTY, H. S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Plant Pathology*, 267–280. 2008b

SHLEZINGER, N., MINZ, A., GUR, Y., HATAM, I., DAGDAS, Y. F., TALBOT, N. J., & SHARON, A. Anti-Apoptotic Machinery Protects the Necrotrophic Fungus *Botrytis cinerea* from Host-Induced Apoptotic- Like Cell Death during Plant Infection. *PloS One*, 7(8). 2011

SILVA, M. C., GUERRA-GUIMARÃES, L., LOUREIRO, A., & NICOLE, M. R. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), 29–38. 2008

SILVA, M. C., NICOLE, M., GUERRA-GUIMARÃES, L., & RODRIGUES, C. J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(4), 169–183. 2002

Southerton, S. G., & DEVERALL, B. J. Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36(6), 483–494. 1990

STÖSSEL, P., LAZAROVITS, G., & WARD, E. Penetration and growth of compatible and incompatible races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean hypocotyl tissue differing in age. *Canadian Journal of Botany*, 58(20), 2594–2601. 1980

THORDAL CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y., & COLLINGE, D. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11(6), 1187–1194. 1997

TORRES, G. A. ., SARRIA, G. A. ., SALCEDO, S., VARÓN, F., AYA, H. A. ., ARIZA, J. G. ., ... MARTÍNEZ, G. Opciones de manejo de la Pudrición del cogollo ( PC ) de la Palma de aceite en áreas de baja incidencia de la enfermedad Management Options for Bud Rot in Oil Palm in Areas With Low Disease Occurances Introducción. *Palmas*, 29, 63–72. 2008

TORRES-LONDOÑO, G. A., SARRIA-VILLA, G. A., VARÓN DE AGUDELO, F. H., & MARTÍNEZ-LÓPEZ, G. Evidencias Circunstanciales de la Asociación de Especies de la Familia Tettigoniidae con el Desarrollo de las Lesiones Iniciales de la Pudrición del Cogollo de la Palma de Aceite. *Revista Palmas*, 29(Edición Especial), 53–62. 2008

TRUJILLO, M., KOGEL, K., & HÜCKELHOVEN, R. Superoxide and Hydrogen Peroxide Play Different Roles in the Nonhost Interaction of Barley and Wheat with Inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(3), 304–312. 2004

UMA, B., & PODILE, A. R. Apoplastic oxidative defenses during non-host interactions of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) with *Magnaporthe grisea*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2), 26. 2015

WANG, C.-F., HUANG, L.-L., BUCHENAUER, H., HAN, Q.-M., ZHANG, H.-C., & KANG, Z.-S. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the incompatible and compatible interaction of wheat—*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4-6), 230–239. 2007

WANG, C.-F., HUANG, L.-L., ZHANG, H.-C., HAN, Q.-M., BUCHENAUER, H., & KANG, Z.-S. Cytochemical localization of reactive oxygen species (O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and peroxidase in the incompatible and compatible interaction of wheat – *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(3-4), 221–229. 2010

WANG, Y., BOUWMEESTER, K., VAN DE MORTEL, J. E., SHAN, W., & GOVERS, F. A novel *Arabidopsis*-oomycete pathosystem: differential interactions

with *Phytophthora capsici* reveal a role for camalexin, indole glucosinolates and salicylic acid in defence. *Plant, Cell & Environment*, 36(6), 1192–1203. 2013

YAMAOKA, N., OHTA, T., DANNO, N., TANIGUCHI, S., MATSUMOTO, I., & NISHIGUCHI, M. The role of primary germ tubes in the life cycle of *Blumeria graminis*: The primary germ tube is responsible for the suppression of resistance induction of a host plant cell. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4-6), 184–191. 2007

YANG, F., LI, W., & JØRGENSEN, H. J. L. Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PloS One*, 8(11), 2013

YANG, Y., ZHAO, J., & XING, H. Different non-host resistance responses of two rice subspecies, japonica and indica, to *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. *Plant Cell*, 423–433. 2014

YANG, Y., ZHAO, J., XING, H., WANG, J., ZHOU, K., ZHAN, G., ... KANG, Z. Different non-host resistance responses of two rice subspecies, japonica and indica, to *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. *Plant Cell Reports*, 33(3), 423–433. 2014

YOSHIOKA, H., NUMATA, N., NAKAJIMA, K., KATOU, S., KAWAKITA, K., ROWLAND, O., ... DOKE, N. *Nicotiana benthamiana* gp91 phox Homologs NbrbohA and NbrbohB Participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Accumulation and Resistance to *Phytophthora infestans*. *Society*, 15, 706–718. 2003

ZHANG, H., WANG, C., CHENG, Y., CHEN, X., HAN, Q., HUANG, L., ... KANG, Z. Histological and cytological characterization of adult plant resistance to wheat stripe rust. *Plant Cell Reports*, 31(12), 2121–2137. 2012

ZHANG, H., WANG, C., CHENG, Y., WANG, X., LI, F., HAN, Q., ... KANG, Z.  
Histological and molecular studies of the non-host interaction between wheat and  
*Uromyces fabae*. *Planta*, 234(5), 979–91. 2011