

La enfermedad de manchas foliares por *Pestalotiopsis* en la palma de aceite endémica del Sudeste Asiático*

Oil Palm Leaf Spot as Endemic Disease in Southeast Asia



TASREN MAHAMOOTH
Investigador Principal en Agroecología
Avanzada, Malasia. Advanced
Agricological Research Sdn.

AUTORES: Tasren Mahamooth, Tan Swee Sian, N. A. Omar, N. F. Jumri, Gog You Ken, Patrick Ng.

CITACIÓN: Mahamooth, T., Sian, T. S., Omar, N. A., Jumri, N. F., Ken, G. Y., & Ng, P. (2019). La enfermedad de manchas foliares por *Pestalotiopsis* en la palma de aceite endémica del Sudeste Asiático. *Palmas*, 40 (Especial Tomo I), 70-76.

PALABRAS CLAVE: manchas foliares, *Pestalotiopsis*, palma de aceite, Sudeste Asiático.

KEYWORDS: Leaf spots, *Pestalotiopsis*, oil palm, Southeast Asia.

*Artículo original recibido en inglés y traducido por Carlos Arenas París.

Resumen

La enfermedad de la mancha foliar *Pestalotiopsis* ha sido previamente reportada en América Latina. Si bien existen informes que asocian la enfermedad con un solo patógeno (*P. palmarum*), algunos estudios reportaron que la enfermedad se atribuía a un complejo fungoso que reunía *P. palmarum*, *P. glandicula*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Gloesporium* y *Helminthosporium*. En Colombia, la infección puede producir defoliación del dosel y en casos graves puede propagarse al dosel superior. En estas condiciones severas, se informó que las reducciones del rendimiento iban de 30 a 5 toneladas de RFF/ha/año en un lapso de 4 años y que la propagación de la enfermedad se atribuía a vectores de insectos Lepidópteros, mientras que el Hemíptero (*Leptopharsa gibbicarina*) también se asoció como vector de la enfermedad. En la última década, hemos observado una creciente incidencia de las enfermedades de mancha foliar, no solo dentro de los límites de Malasia, sino en todo el Sudeste Asiático.

En la provincia china de Hainan, se informó que las palmas de dos años estaban seriamente infectadas con síntomas de la enfermedad de la mancha foliar que producían necrosis de los folíolos y desecación prematura del pecíolo. El patógeno fue identificado como *Pestalotiopsis microspora*. En Tailandia se reportaron síntomas similares en la palma de aceite y el patógeno fue identificado como *Pestalotiopsis theae*. Para este trabajo se recolectaron folíolos de palma de aceite que mostraban manchas necróticas similares a los de los dos últimos informes en diferentes plantaciones de Malasia, al igual que en la Isla de Belitung, en Indonesia. En todos los casos, la intensidad de la enfermedad de la mancha foliar aumentaba en los pecíolos más viejos y en unos pocos casos observamos que la enfermedad infectaba el dosel superior, lo que difiere de los trastornos producidos por la enfermedad en Latinoamérica.

Abstract

Pestalotiopsis leaf spot disease, considered a minor disease, was previously reported in Latin America. While there are reports that associate the disease to a single pathogen (*P. palmarum*), some studies reported that the disease was attributed to a fungal complex involving *P. palmarum*, *P. glandicula*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Gloeosporium* and *Helminthosporium*. In Colombia, infection can cause defoliation of the canopy and in severe cases can spread to the upper canopy. Under such severe conditions, yield reductions from 30 to 5 tons FFB/ha/yr over a 4-year period were reported and the disease spread was attributed to Lepidoptera insect vectors while Hemiptera (*Leptopharsa gibbicularina*) was also associated as a vector for the disease. In the last decade, we have observed increasing incidences of leaf spot diseases not only within Malaysia but across Southeast Asia as well. In China's Hainan Province, two-year-old palms were reported as heavily infected with leaf spot disease symptoms, which resulted in pinnae necrosis and premature frond desiccation. The pathogen was identified as *Pestalotiopsis microspora*. In Thailand, similar symptoms were reported on oil palm with the pathogen identified as *Pestalotiopsis theae*. In our study, oil palm pinnae samples exhibiting necrotic spots similar to the latter two reports were collected from different states across Malaysia as well as Belitung Island, Indonesia. In all cases, the intensity of leaf spot disease increased with older fronds and only in rare cases did we observe the disease to infect the upper canopy, thus differing from the Latin American disease condition.

Introducción

Las manchas foliares por *Pestalotiopsis*, considerada una enfermedad menor de la palma de aceite, fue reportada anteriormente en Latinoamérica. La incidencia de esta enfermedad parece estar asociada con brotes de insectos lepidópteros (Martínez & Plata-Rueda, 2013), mientras que se ha reportado que *Leptopharsa gibbicularina* es un vector para la enfermedad (Aldana *et al.*, 2009). En Colombia, la infección puede causar la defoliación del dosel y, en casos extremos, expandirse al dosel superior. Bajo estas condiciones severas, se han reportado reducciones en el rendimiento del cultivo de hasta 25 toneladas de RFF/ha/año en un perio-

do de cuatro años, según lo estudiado por Martínez & Plata-Rueda (2013). Si bien hay varias investigaciones que relacionan la enfermedad con un único patógeno *P. Palmarum* (reportado por primera vez por Labarca *et al.*, 2006), también ha sido atribuida a un complejo de hongos que involucra *P. palmarum*, *P. glandicula*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Gloeosporium* y *Helminthosporium* (Escalante *et al.*, 2010).

No es sorpresa que el Sudeste Asiático, siendo una de las tres principales regiones productoras, albergue una enfermedad similar que infecta las palmas de aceite plantadas en el campo. En la última década,

hemos observado un aumento en las incidencias de manchas foliares, no solo en Malasia, sino también a lo largo del Sudeste Asiático. En la provincia china de Hainan, al este de Asia, se informó que palmas de dos años de edad estaban altamente infectadas con síntomas de la enfermedad, lo que resultó en la necrosis de la fronda y llevó a su desecación prematura. El patógeno fue identificado como *Pestalotiopsis microspora* (Shen *et al.*, 2014). En Tailandia se reportaron síntomas similares en la palma de aceite, con *Pestalotiopsis theae* (Suwannarach *et al.*, 2013). En nuestro estudio, recolectamos muestras de hojas de palma de aceite de varios estados de Malasia y de la Isla de Belitung en Indonesia, que mostraban manchas necróticas similares a las de las dos últimas investigaciones (Suwannarach *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2014), con el fin de identificar el patógeno.

Materiales y métodos

Recolección de aislados

Se tomaron muestras de la hoja número 17 en palmas de aceite infectadas naturalmente, de entre 10 y 12 años de edad, a lo largo de Malasia peninsular. Todos los hongos fueron cultivados en agar de papa y dextrosa (APD) a 28 °C. Cuando fue posible, se derivaron cultivos de esporas individuales de cada aislado y se almacenaron a -80 °C (mantenimiento del cultivo a largo plazo) o a 20 °C en agua destilada estéril.

Identificación

Los aislados fueron agrupados inicialmente como *Pestalotiopsis* o como otros hongos con base en su caracterización morfológica y, posteriormente, identificados utilizando técnicas moleculares. Se extrajo el ADN total del micelio obtenido de 107 cultivos de *Pestalotiopsis* en APD por entre cinco y siete días a 28 °C con un kit de aislamiento de ADN Mo Bio PowerPlant® Pro, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó la amplificación PCR de las regiones ITS1, ITS2 y 5.8S de ADNr, junto con los genes de β -tubulin (TUB) parcial y los del factor de elongación de traducción parcial 1-alfa (TEF), según lo descrito por Maharachchikumbura *et al.* (2014). La identificación taxonómica de *Pes-*

talotiopsis se basó en el análisis filogenético utilizando los conjuntos de datos combinados (ITS, TUB y TEF), junto con las secuencias de referencia de GenBank, citadas en el estudio mencionado anteriormente. Para otros hongos, es estudio se basó únicamente en sus regiones ITS1, ITS2 y 5.8S ADNr.

Pruebas de patogenicidad

Se realizaron pruebas de patogenicidad con base en dos enfoques: en folíolos inmaduros desprendidos (ensayo de disco foliar) y en palmas de vivero de tres meses de edad. El primero se hizo para determinar la existencia de diferencias notables entre los aislados del mismo taxón de *Pestalotiopsis*. El segundo, para confirmar la patogenicidad de diferentes especies evaluada con base en inoculantes individuales o en conjunto con otros hongos. Para el primer enfoque, se sumergieron las hojas en una solución de lejía al 5 % (v/v) durante un minuto; se enjuagaron en agua destilada estéril (ADE) y se secaron con papel secante antes de colocarlas en agar-agua (0,8 % p/v de agar bacteriológico). Previo a inocularlas con un tapón de micelio en agar de 5 mm que contenía esporas, se ocasionaron ligeras heridas en las hojas a analizar. Las hojas inoculadas se cultivaron durante siete días a 28 °C. Para el segundo enfoque, se inocularon palmas saludables con una suspensión de esporas. Antes de esto, las plántulas germinadas se plantaron en arena lavada con ácido y esterilizada por calor, y se cultivaron durante tres meses, suministradas con riego regular, fertilización, iluminación (fotoperiodo de 16:8) y sin fungicidas. Las palmas fueron transferidas a cámaras húmedas de plástico (seis por cámara) y se dejaron aclimatar durante dos semanas más. La temperatura del aire ambiente y la humedad relativa al interior de las cámaras húmedas se mantuvo a 26 ± 2 °C y a $60 \pm 2,5$ %, respectivamente. La inoculación se realizó con suspensiones de esporas recién preparadas (10 ml x 108 esporas/ml por cámara), aplicadas con un rociador de mano. Se recogieron de cultivos de dos semanas, con aproximadamente 5ml 0,05 % (v/v) de Tween 80 (polisorbato) (por placa de Petri), y fueron filtradas con lana de vidrio entre dos y tres veces para eliminar cualquier resto notable de agar. Se determinó la cuenta de esporas con un hemocitómetro y se ajustó

el volumen a aproximadamente 108 esporas/ml con una solución de Tween 80 al 0,05 % (v/v).

Después de la inoculación, las plantas fueron sometidas condiciones de oscuridad durante 48 horas y, posteriormente, a un fotoperiodo de 16:8, monitoreando los síntomas durante cuatro semanas. El aislamiento del inoculante se realizó según lo descrito anteriormente y se confirmó mediante técnicas moleculares.

Resultados y discusión

La enfermedad de manchas foliares que afecta los cultivos de palma de aceite en Malasia ha sido des-

crita de forma similar en Tailandia (Suwannarach *et al.*, 2013) y en China (Shen *et al.*, 2014), pero se ha atribuido a dos especies diferentes de *Pestalotiopsis*. Con base en nuestro estudio, los síntomas descritos en estas investigaciones parecen ser similares a los observados en Malasia (Figura 1). A partir del análisis, el aislamiento y la identificación taxonómica revelaron que se aisló una serie de diferentes especies de hongos ascomicetos de los tejidos enfermos, aunque consistentemente en todas las muestras. Además, se obtuvieron diferentes *Pestalotiopsis* spp. (Tabla 1).

Nuestros hallazgos se correlacionan con varios informes de que el género *Pestalotiopsis* no es es-

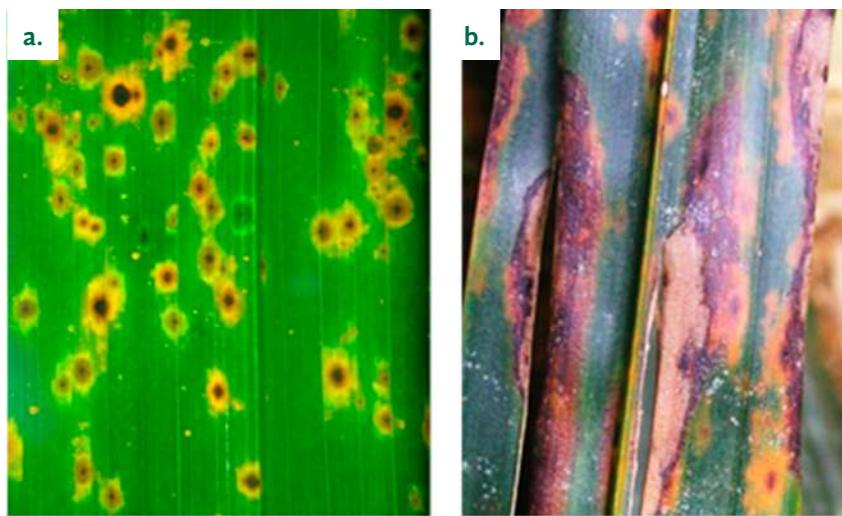


Figura 1. Síntomas comunes de enfermedad de manchas foliares observadas en el campo: [a] manchas circulares translúcidas y elípticas de color naranja con centro hundido de color marrón en el centro de la lesión. El halo de color naranja a amarillo solo es evidente contra una fuente de luz, de lo contrario parece como una mancha de color naranja oscuro; [b] bajo condiciones severas, las manchas localizadas se unen y llevan a lesiones necróticas que eventualmente mueren y se vuelven secas y quebradizas.

Tabla 1. Resumen de taxones de *Pestalotiopsis* asignados con base en un enfoque filogenético multilocus con genes ITS1, ITS2, 5.8S ADNr TUB y TEF. Regiones de Malasia peninsular: I sur, II central y III norte.

Especie	Región de la muestra	No. de aislados (este estudio)
<i>Pestalotiopsis theae</i>	I-III	36
<i>Pestalotiopsis crassiuscula</i>	Belitung, Indonesia	5
<i>Pestalotiopsis olivacea</i>	II	4
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	I, II	9
<i>Pestalotiopsis zonata</i>	II, III	3
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	I-III	18
<i>Pestalotiopsis virgulata</i>	I-III	7
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	I-III	15
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	I, III	10

pecífico del hospedador, debido a que se han aislado diferentes especies del mismo (Keith *et al.*, 2005; Maharachchikumbura *et al.*, 2011). La presencia de diversos taxones de *Pestalotiopsis* también complicó el diagnóstico del patógeno, dado que el género *Pestalotiopsis* igualmente puede existir como un endófito (Watanabe *et al.*, 2010; Maharachchikumbura *et al.*, 2011). Tras haber obtenido más de cien aislados en este estudio, las pruebas de patogenicidad en cada uno fueron consideradas demasiado laboriosas. De igual forma, postulamos que los aislados de los mismos taxones podrían causar diferencias en su virulencia. El ensayo de patogenicidad de disco foliar sirvió como una detección rápida, permitiendo así la observación de todos los aislados. La presencia de una lesión necrótica de más de 3 mm causada por el tapón de agar fue considerada como un indicador positivo, en comparación con los controles. Estos consistieron en un tapón de agar sin micelio y de *Trichoderma harzianum*, un hongo beneficioso. Con el ensayo de disco foliar no notamos ninguna diferencia significativa entre los aislados del mismo taxón, mientras que *P. theae* presentó la lesión necrótica más grande entre todos los otros taxones ($p < 0,05$) (datos no presentados). En este estudio, las lesiones necróticas no se parecían a los síntomas característicos de la mancha foliar elíptica con un halo de color naranja, posiblemente debido a las condiciones del ensayo, utilizando folíolos inmaduros de palma de aceite en lugar de maduros. En cualquier caso, las lesiones necróticas son suficientes como un indicador positivo.

El ensayo de patogenicidad con plantas de vivero requirió varias rondas de optimización. Es importante destacar que se puede inducir la infección temprana a través de heridas, aunque no es necesario en la medida en que se mantengan los niveles de temperatura y humedad. Las respuestas a la enfermedad, es decir la gravedad, también puede variar dependiendo de los materiales de siembra (linajes genéticos), además de las condiciones de crecimiento de las palmas antes de la inoculación; es decir, en suelos no estériles vs. en arena estéril lavada con ácido. Después de optimizar el protocolo de inoculación en viveros, se evaluó la patogenicidad sin causar heridas. Además de los síntomas de la enfermedad, presencia de manchas necróticas, también se clasificó la gravedad con base en el número de manchas foliares. Para cada taxón de *Pestalotiopsis*,

se seleccionaron dos o tres aislados para realizar pruebas de patogenicidad y evaluarlos independientemente. Las pruebas revelaron que *P. theae*, *P. microspora*, *P. virgulata*, *P. versicolor* y *P. crassiuscula* eran patógenos a la palma de aceite de vivero, pero que otros taxones de *Pestalotiopsis* no lograron inducir síntomas de la enfermedad (Figura 2). Los resultados del ensayo de patogenicidad de disco foliar también se correlacionaron con el estudio de inducción en vivero ($R^2 = 0,87$). Sin embargo, los síntomas de la enfermedad con aislados individuales no se asemejaban a los síntomas en campo y, a menudo, carecían del halo de color naranja alrededor de los centros color marrón.

A partir de este estudio y de los trabajos de aislamiento, se identificaron un total de 23 géneros de ascomicetos de 242 aislados de hongos. Consecuentemente, *Phomopsis phaseoli* y *Aspergillus niger* también fueron aislados junto con *Pestalotiopsis* spp. Sin embargo, la inoculación de plantas saludables con una suspensión de esporas conformada por *P. theae*, *P. phaseoli* y *A. niger* (Figura 3) no solo resultó en síntomas de la enfermedad bastante similares a los de campo, sino que también aumentó la gravedad de la misma. El reaislamiento exitoso de los tres inoculantes, junto con los síntomas esperados de la enfermedad, cumple con los postulados de Koch.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron según lo descrito en Materiales y métodos. Cada tratamiento consistió en tres cámaras húmedas, con seis plantas por cámara. La patogenicidad también estuvo basada en la reproducibilidad entre los tres tratamientos replicados.

Conclusión

En este estudio confirmamos que la palma de aceite alberga una variedad de *Pestalotiopsis* spp., incluyendo taxones patógenos y no patógenos y, además, que la gravedad de la enfermedad es influenciada por sus interacciones con otros hongos. Si bien *Phomopsis phaseoli* y *Aspergillus niger* estuvieron implicadas para influenciar los síntomas y la gravedad de la enfermedad, otros hongos que ocurren naturalmente también pueden hacerlo. La ocurrencia, así como la interacción entre varios taxones de hongos, tiene implicaciones sobre las medidas de control de la enfermedad, determinando la concentración inhibitoria (IC50) de fungicidas.

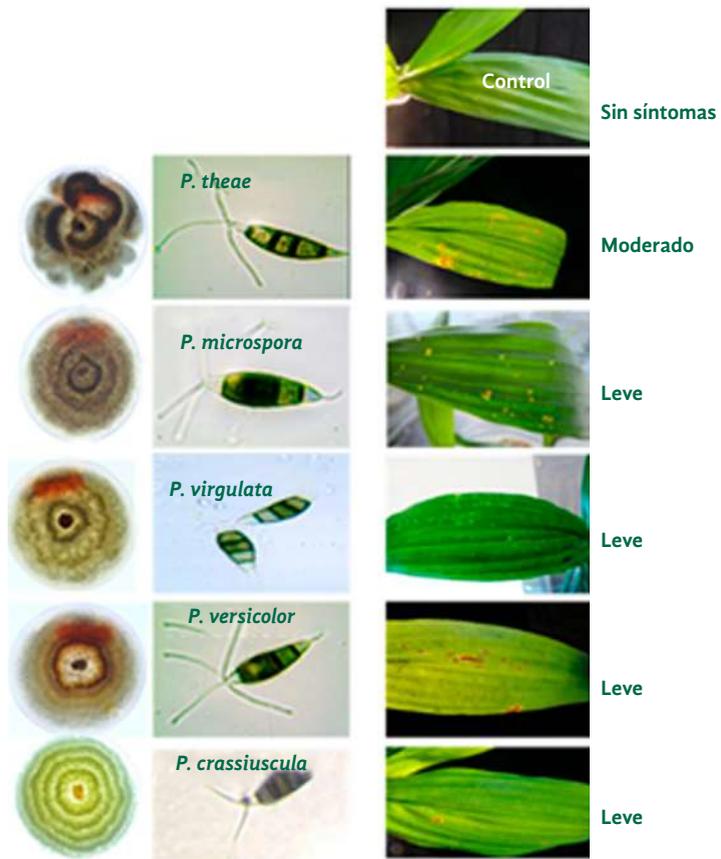
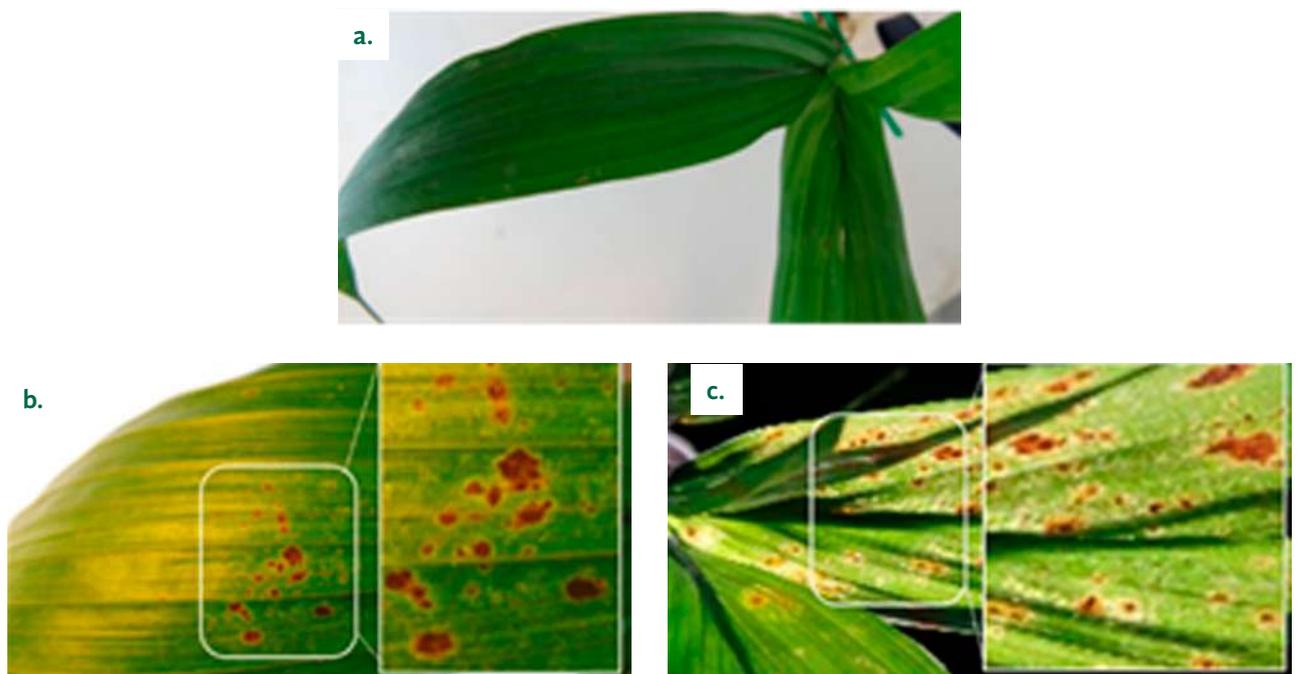


Figura 2. Síntomas de la enfermedad de manchas foliares en palma de aceite de vivero inoculada con diferentes taxones de *Pestalotiopsis*.

Figura 3. Síntomas de enfermedad de manchas foliares en palma de aceite de vivero inoculada con a. *P. theae*, b. *A. niger* y c. *P. phaseoli*.



Agradecimiento

Los autores queremos agradecer a nuestros patrocinadores, Messrs Kuala Lumpur Kepong Berhad y Boustead Plantations Berhad, por su fuente continua de financiación, el acceso a sus plantaciones de palma de aceite y el permiso para publicar este estudio.

Referencias

- Aldana, R. C., Aldana, J. A., Guerrero, H. C., & Bautista, P. N. (2009). *Manual de plagas de la palma de aceite en Colombia*. Bogotá: Cenipalma.
- Escalante, M., Damas, D., Márquez, D., Gelvez, W., Chacón, H., Díaz, A., & Moreno, B. (2010). Diagnóstico y evaluación de *Pestalotiopsis* e insectos inductores en plantaciones de palma aceitera al sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. *BioAgro*, 22, 211-216.
- Keith, L. M., Velásquez, M. E., & Zee, F. T. (2005). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Disease*, 90, 16-23.
- Labarca, M., Sanabria, N., & Arcia, A. (2006). *Pestalotiopsis palmarum* Cooke pathogenicity on nursery-oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plants. *Revista Facultad de Agronomía*, 23, 414-421.
- Maharachchikumbura, S. S., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). *Pestalotiopsis*, morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50, 167-187.
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121-186.
- Martínez, L. C., & Plata-Rueda, A. (2013). *Lepidoptera* vectors of *Pestalotiopsis* fungal disease: first record in oil palm plantations from Colombia. *International Journal of Tropical Insect Science*, 33, 239-246.
- Shen, H. F., Zhang, J. X., Lin, B. R., & Pu, X. M. (2014). First report of *Pestalotiopsis* microspora causing leaf spot of oil palm (*Elaeis guineensis*) in China. *Disease Notes*, 10, 1429.
- Suwannarach, N., Sujarit, K., Kumla, J., Bussaban, B., & Lumyong, S. (2013). First report of leaf spot disease on oil palm caused by *Pestalotiopsis theae* in Thailand. *Journal of General Plant Pathology*, 79, 277-279.
- Watanabe, K., Motohashi, K., & Ono, Y. (2010). Description of *Pestalotiopsis pallidotheae*: a new species from Japan. *Mycoscience*, 51, 182-188.