

ISSN 1390-4663

**REVISTA
CONGRESO DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA**

Volumen 8

Junio 2013

Copyright © 2013 *ESPE*. All Rights Reserved.

DETECCIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA MARCHITEZ LETAL EN PLANTACIONES COMERCIALES DE PALMA ACEITERA EN EL ECUADOR MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR Y METAGENÓMICA

Natasha Baer¹, Eduardo Morillo¹ y Gustavo Bernal²

¹ Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Estación Experimental Santa Catalina, Dpto. Nacional de Biotecnología. Quito-Ecuador. Mail: biotecnologia.eesc@iniap.gob.ec

² Centro de Investigaciones en Palma Aceitera-CIPAL. ANCUPA. La Concordia

RESUMEN

La Marchitez Letal (ML) es un problema fitosanitario que afecta al cultivo de la palma aceitera, cuya sintomatología se ha reportado estar asociada con la presencia de un fitoplasma transmitido por el hemíptero *Myndus crudus*. Aunque síntomas de la ML en plantaciones comerciales en Ecuador sugieren la incidencia de la enfermedad, la presencia de este patógeno aún no ha sido demostrada. En esta investigación se validó en una primera etapa, la detección molecular del fitoplasma con el fin de monitorear su presencia en plantaciones comerciales de La Concordia y Orellana. La detección del fitoplasma se realizó utilizando primers universales de la región espaciadora de los genes 16S y 23S aplicando una reacción de Nested-PCR con la combinación de cebadores P1F-P7R y R16mF2-R16mR1 los cuales amplifican un fragmento de 1430 pb. Para el monitoreo de plantaciones comerciales, se analizaron 20 plantas con sintomatología de ML, en siete plantaciones, detectándose la presencia del fitoplasma en 16 casos, y en ningún caso en ADN de plantas sanas muestreadas en las mismas plantaciones. Por otro lado, se analizó la diversidad microbiana de suelo aplicando la técnica de metagenómica, con el fin de determinar si existe alguna asociación con la incidencia de la enfermedad. El análisis metagenómico de suelo se realizó para los 16 casos positivos y ocho negativos, observándose que no existe una variación asociada con la diversidad microbiana entre plantas con sintomatología de ML y plantas sanas.

Palabras clave: Marchitez Letal, palma aceitera, PCR, metagenómica, Ecuador.

ABSTRACT

Lethal wilt (LW) is a problem that affects oil palm cultivation, whose symptoms have been reported to be associated with the presence of a phytoplasma transmitted by hemipteran *Myndus crudus*. Although symptoms of ML in commercial plantations suggest

the incidence of the disease in Ecuador, the presence of this pathogen has not yet been demonstrated. This research validated as a first step, the molecular detection of phytoplasmas in order to monitor its presence in commercial plantations of La Concordia and Orellana. Detection was performed using phytoplasma universal primers from the spacer region of the 16S and 23S genes applying Nested-PCR reaction with the primer combination P1F-P7R and R16mF2-R16mR1 which amplify a 1430 bp fragment. For monitoring of commercial plantations, we analyzed 20 plants with symptoms of ML in seven plantations, where the presence of phytoplasma was detected in 16 cases, and in any case in DNA from healthy plants sampled in the same plantation. Furthermore, microbial diversity was analyzed using soil metagenomic technique, to determine any association with the incidence of the disease. Soil metagenomic analysis was performed for the 16 positive and eight negative cases, showing that there is no variation associated with microbial diversity among plants with symptoms of ML and healthy plants.

Key words: Lethal wilt, oil palm, PCR, metagenomic, Ecuador.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de aceite de palma en el Ecuador se ve afectada por el bajo rendimiento del cultivo debido a la presencia de numerosas enfermedades, producidas por hongos, bacterias, nematodos y protozoarios, además de plagas de insectos barrenadores y defoliadores que afectan tanto a plantas jóvenes como a plantas adultas, siendo en muchos casos la eliminación de las mismas el único método de erradicación de estos problemas [1].

Una de estas enfermedades es la Marchitez Letal (ML) la cual se reportó por primera vez en Colombia en 1994, en la zona de los Llanos Orientales. Inicialmente se registró en híbridos intraespecíficos de *E. guineensis* y recientemente en híbridos interespecíficos entre *E. guineensis* y *E. oleifera*. En Colombia se han erradicado más de 50 000 plantas

afectadas, abarcado una extensión aproximada de 800 has de distintas plantaciones [2].

En el Ecuador la enfermedad se registra por primera vez en el 2006, en la zona de San Lorenzo, extendiéndose a Santo Domingo, Quevedo y Orellana, y produciendo la pérdida total de aproximadamente 200 has del cultivo. La presencia de la enfermedad se da por focos de rápida diseminación, siendo la erradicación de las plantas afectadas la única medida de mitigación [3].

La enfermedad se presenta tanto en plantas jóvenes como en plantas adultas, comúnmente entre los tres y cuatro años de cultivo. Los primeros síntomas de la enfermedad son el amarillamiento y secamiento de los folíolos, empezando por las puntas y bordes, como se observa en la Figura 1. Lo último que se llega a necrosar es la flecha o meristemo. Desde la aparición de los primeros síntomas hasta la muerte de la planta pueden transcurrir de una a tres semanas [4].



Figura 1. Amarillamiento y secamiento de los folíolos con ML. Izquierda en estado inicial y derecha en estado avanzado

Otro síntoma inicial característico es la pérdida de brillo de los frutos, seguido por el secamiento y el fácil desprendimiento de los mismos debido a que presentan pudrición en sus bases (Figura 2). Por estos síntomas se concluye que el patógeno es de carácter sistémico y letal [2].

Se han planteado diferentes hipótesis sobre el agente causal de ML; las primeras investigaciones y observaciones de los síntomas fueron comparadas con los registros bibliográficos de enfermedades de la palma de aceite reportados a nivel mundial. Con el objetivo de identificar el agente causal se han realizado aislamientos de hongos y bacterias, pruebas de patogenicidad, técnicas de ELISA y biología molecular, analizando diferentes microorganismos sospechosos [2].



Figura 2. Frutos de palma sana (fila superior) y de palma afectados por ML (fila inferior)

Por la sintomatología existente, se propuso que el agente causal podría ser un tipo de fitoplasma, por tener antecedentes de causar enfermedades en cocoteros. En estudios realizados por Álvarez en el CIAT en el 2006, mediante técnicas moleculares se detecta la presencia de fitoplasmas en varios tejidos de plantas afectadas por ML. Sin embargo, hasta el momento la hipótesis de un fitoplasma como agente causal, no es consensuada ya que no se conoce una prueba contundente que lo confirme [4].

Tampoco se ha descartado la posibilidad que el agente causal provenga del suelo [3]. por lo que es necesario realizar un estudio de diversidad bacteriana. Ante esta situación, en la actualidad el uso de herramientas moleculares, ofrece la posibilidad de identificar la presencia de microorganismos cultivables y no cultivables (que son la gran mayoría de la biodiversidad existente). La metagenómica es una técnica de biología molecular que consiste en el uso de marcadores universales como el gen del 16S ribosomal, que permiten identificar a todos los microorganismos encontrados en un nicho ecológico, sea este suelo, agua (ríos y mares) y hasta en organismos vivos [5]. En relación a la identificación de un agente causal de enfermedades, la metagenómica es una novedosa y prometedora metodología, que nos permite analizar genomas de microorganismos que no pueden ser cultivados, y es por lo tanto una estrategia utilizada en esta investigación.

II. METODOLOGÍA

A. Colección de muestras

Se tomaron muestras de tejido vegetal de plantas sintomáticas y asintomáticas de ML, en plantaciones

en Santo Domingo de los Tsáchilas y Orellana. Se colectaron además 10 gramos de muestras de suelo de la rizósfera de cada una de las plantas muestreadas.

B. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN a partir de muestras vegetales se utilizó el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN (No. Cat. 69104). Para la extracción de ADN metagenómico de suelo se utilizó el kit comercial PowerSoil® DNA Isolation de MO-BIO (No. Cat. 12888-50).

C. Detección de fitoplasmas

Se utilizaron cebadores universales reportados anteriormente [6] y [7]. Se realizó una Nested-PCR con los primers P1F (5'- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T -3' y P7R (5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT -3') en 1era PCR y los primers R16mF2 (5'- CAT GCA AGT CGA ACG GA -3') y R16mR1 (5'- CTT AAC CCC AAT CAT CGA C -3') en la 2da PCR, las condiciones de la reacción consistieron de 40 ng de ADN, Buffer PCR 1X, 200 µM de dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mg/ml de BSA y 2 U de Taq polimerasa, en un volumen final de 25 µl. El programa de amplificación se realizó con una denaturación inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 seg. a 94°C, 1 min a: 50°C, y 1 min a 72°C, con una extensión final a 72°C por 10 min y un mantenimiento a 4°C.

Una vez estandarizada la detección, se realizó un barrido en todas las muestras de ADN obtenida de las muestras vegetales en el muestreo.

D. Análisis metagenómico de suelo

Para los casos positivos para fitoplasma se realizó la secuenciación de la región V5 (región hipervariable) del gen 16S del ADN metagenómico de suelo para analizar la diversidad bacteriana. Se incluyeron también muestras negativas en el análisis. Se envió 200 ng de ADN metagenómico de cada muestra a los laboratorios EUREKA GENOMICS Corp. en US para su pirosecuenciación.

Con los resultados obtenidos del análisis metagenómico se realizó un análisis multivariado de Componentes Principales (ACP) utilizando el programa estadístico InfoStat v.2011e.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Colección de muestras

Se colectaron 29 muestras (20 plantas con sintomatología de ML, y diez asintomáticas) de cuatro plantaciones visitadas en Santo Domingo de los Tsáchilas y tres en Orellana.

B. Extracción de ADN

Se obtuvo buena calidad de ADN tanto a partir de muestras vegetales como de suelo. Los rendimientos promedio obtenidos fueron de 2.2 µg y 1.3 µg respectivamente, exceptuando en las muestras de suelo de plantas asintomáticas en donde no se obtuvo un buen rendimiento de ADN (Figura 3).

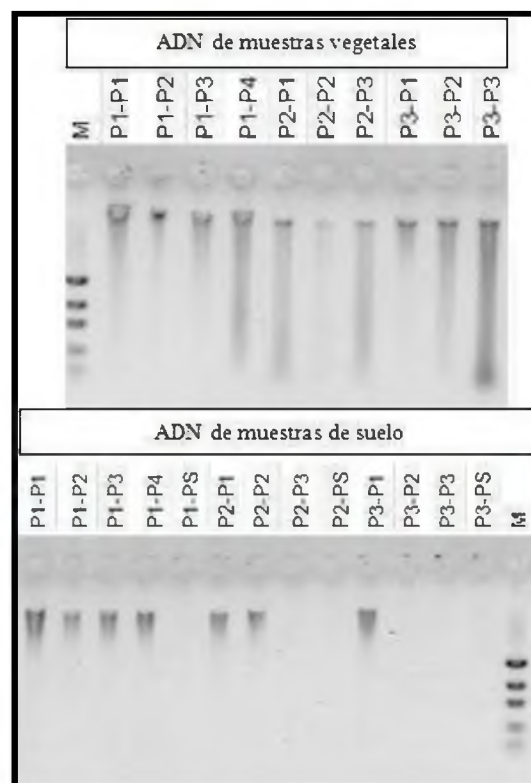


Figura 3. ADN genómico de muestras vegetales y de suelo de las plantaciones 1.2 y3 de Santo Domingo de los Tsáchilas. Marcador de peso molecular: Low Mass Ladder INVITROGEN.

C. Detección de fitoplasmas

En 16 casos de 20 muestras con sintomatología de ML, se obtuvo amplificación del fragmento de aproximadamente 1430 pares de bases en 2da PCR, asociado con la presencia del fitoplasma, mientras que en ninguna de las plantas asintomáticas se obtuvo el amplicón (Figura 4).

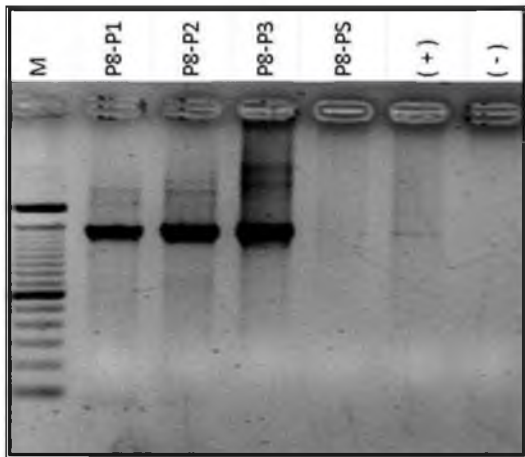


Figura 4. Detección de fitoplasma asociado con ML en muestras de Palmar del Rio en Orellana. Marcador de talla (100bp). Carriles P8-P1, P8-P2 y P8-P3 3: plantas sintomáticas, P8-PS: Planta asintomática. Carriles 6 y 7: control positivo y negativo.

Con este resultado se validó el método reportado por Álvarez (2006) para la detección molecular del fitoplasma asociado con ML en palma aceitera. Al no detectar la presencia del fitoplasma en plantas asintomáticas se corrobora la hipótesis de que éste se encuentra relacionado con la enfermedad. En algunos casos de plantas con síntomas de ML, no se detectó la presencia del fitoplasma, posiblemente debido a la complejidad de la marchitez en palma y la posible presencia de diferentes agentes causales en un mismo hospedero.

D. Análisis metagenómico

Se analizaron los datos enviados por Eureka Genomics, en donde se encuentran detallados el número de lecturas de cada OTU (Unidad Taxonómica Operacional) para cada una de las muestras, se observó que los géneros más abundantes son: *Acidobacteria*, *Streptophyta*, *WS3*, *Propionibacterium*, *Terrabacter*, *Ktedonobacter* y *Ralstonia*. El ACP de la diversidad metagenómica cualitativa y cuantitativa en muestras de suelo de plantaciones con incidencia de ML determinó que no existe una relación directa de la diversidad existente con la presencia o ausencia del fitoplasma, y por lo tanto de la ML. Ya que no se observa un agrupamiento entre plantas asintomáticas y sintomáticas (Figura 5).

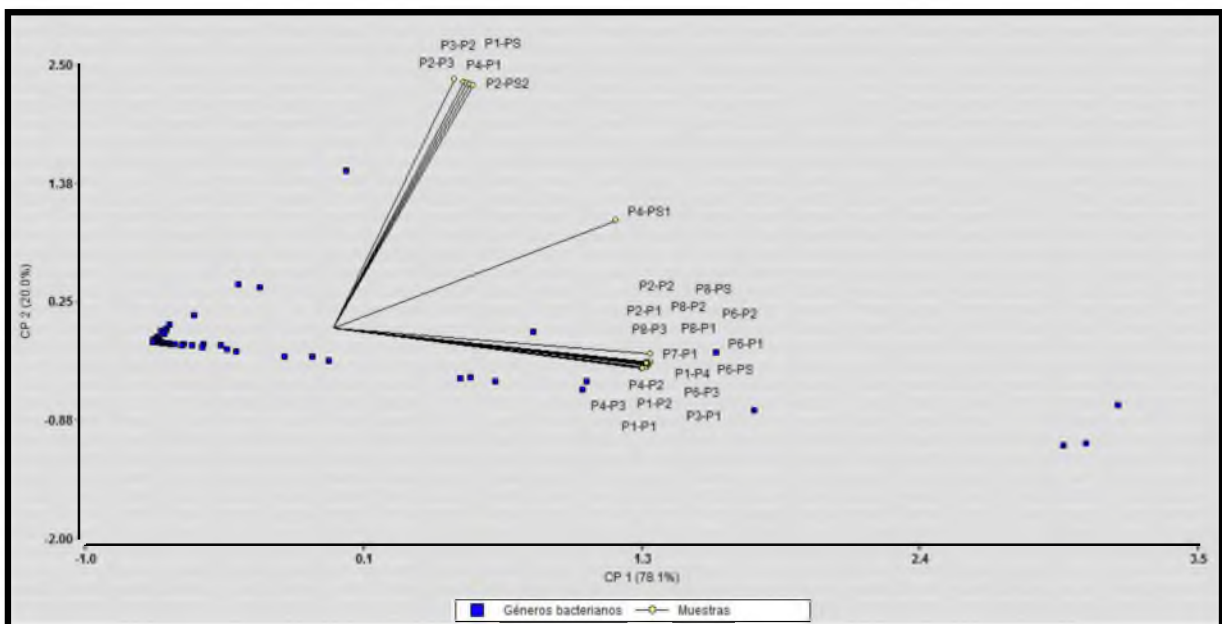


Figura 5. Análisis de componentes principales (ACP) con los datos de diversidad metagenómica de suelo, realizado en el programa InfoStat v.2011e .

El análisis metagenómico de suelo no aportó en cuanto a la posible identificación de otros agentes microbianos relacionados con la ML. Este resultado corrobora al momento la hipótesis de la causalidad del fitoplasma en ML, de acuerdo a lo reportado por [6], el mismo que es transmitido por un vector y al ser un parásito obligado no podría encontrarse en el suelo. Sin embargo está en curso el análisis metagenómico de muestras vegetales cuyo resultado permitirá determinar si otros microorganismos están asociados con la ML.

IV. CONCLUSIONES

- Se validó la técnica de detección molecular del fitoplasma asociado con la Marchitez Letal.
- Se confirmó la presencia del fitoplasma asociado con la Marchitez Letal en plantaciones comerciales de palma en el Ecuador.
- No existen diferencias en la diversidad microbiana de suelo de plantas enfermas y sanas de ML, lo que indica que la enfermedad no está asociada con un factor biótico del suelo.

V. AGRADECIMIENTOS

A la Asociación de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA) por el financiamiento de esta investigación y al Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP por su colaboración en el desarrollo técnico y científico de la misma.

VI. REFERENCIAS

- [1]. Ayala, E. (2008). PALMA AFRICANA: Estudio Agroindustrial en el Ecuador: Competitividad de la Cadena de Valor y Perspectivas de Mercado. Ministerio de Industrias y Competitividad y la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial, Quito. Disponible en línea: <http://issuu.com/mipro/docs/palma>. Extraído el 11 de Marzo del 2012.
- [2]. Gutiérrez, D. (2008). La Marchitez letal de la Palma de Aceite. Grupo Upía, Colombia. Disponible en línea: http://portal.fedepalma.org/congreso/2008/presentaciones/3_Marchitez_Letal.pdf. Extraído el 15 de Marzo del 2012.

[3]. ANCUPA (2012). El cultivo de palma aceitera en el Ecuador. Disponible en línea: <http://www.ancupa.com>. Extraído el 20 de enero del 2012.

[4]. Rocha, P., Tovar, J., Gutiérrez, D., & Mosquera, M. (2007). Marchitez letal en Palma de Aceite. Bogotá: Boletín técnico No. 21.

[5]. Rolf, D. (2005). The Metagenomics of Soil. Nature Reviews, 470-478.

[6]. Álvarez, E. (2006). DNA Sequence Analysis of the 16S rRNA region of Phytoplasma associated with lethal wilt in oil palm. Fitopatología Colombiana, 39-44.

[7]. Smart, C., Schneider, B., Blomquist, C., Guerra, L., Harrison, N., & Ahrens, U. (1996). Phytoplasm-Specific PCR Primers Based on Sequences of 16S-23S rRNA Spacer Region. Applied and Environmental Microbiology, 2988-2993.