

IDENTIFICACIÓN DEL O LOS AGENTE(S) CASUAL(ES) DE LA MARCHITEZ LETAL EN PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis*), MEDIANTE TÉCNICAS DE METAGENÓMICA Y BIOINFORMÁTICA

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: biotecnología.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 18 casos, y en ningún caso en ADN de plantas sanas muestreadas en las mismas plantaciones. Con la secuenciación del fragmento de detección se determinó que el fitoplasma encontrado en el Ecuador es el mismo que se ha reportado en Colombia (AY739023.1) como el agente causal de la enfermedad. Por otro lado, se analizó la diversidad microbiana de suelo y material vegetal aplicando la técnica de metagenómica, con el fin de determinar si existe alguna asociación de esta con la incidencia de la enfermedad. El análisis metagenómico se realizó para los 18 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 phytoplasm 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 phytoplasm 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 phytoplasm was detected in 18 cases, and in any case in DNA from healthy plants sampled in the same plantation. Sequencing of the detection fragment determined that the phytoplasm is the same to the one reported in Colombia (AY739023.1) as the causal agent of the disease. Furthermore, microbial diversity was analyzed using soil metagenomic technique, to determine any association with the incidence of the disease. Metagenomic analysis was performed for the 18 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 foliolos, 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 foliolos 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 μ M de dNTPs, 0.2 μ M 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 μ l. 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 por 5 min, 50°C, y 1 min a 72°C, con una extensión final a 72°C por 10 min y un mantenimiento a 4°C. Esta metodología fue validada mediante un control positivo de fitoplasma causante de la Marchitez Letal enviado por el CIAT (Colombia).

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

Se tomaron productos PCR de una planta positiva para fitoplasmas de cada plantación y el control positivo y se enviaron para su secuenciación a la empresa MacroGen Inc. (Corea) para la identificación de los fitoplasmas detectados. Con las secuencias obtenidas se realizaron alineamientos en BLAST y en el programa LALIGN.

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.

E. Análisis metagenómico de muestras vegetales

Se amplificaron fragmentos del gen 16S con primers universales para bacterias U341F (5'- CCT ACG GGR SGC AGC AG -3') y U1053R (5'- CTG GTG TCG TGA GAT G -3'), las condiciones de la reacción consistieron de 40 ng de ADN, Buffer PCR 1X, 200 μ M de dNTPs, 0.2 μ M 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 μ l. Las condiciones de amplificación consistieron en una denaturación inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 45 seg a 55°C y 1 min a 70°C, con una extensión final a 70°C por 8 min. El producto obtenido de 712 pb fue purificado con el kit PCR Purification Kit marca Invitrogen (No. Cat. K3100-01).

Los productos PCR fueron clonados por medio del kit pGEM®-T Easy Vector Systems II marca Promega (No. Cat. A1380) y se seleccionaron 10 colonias blancas por cada muestra conteniendo los productos PCR clonados. Se procedió a realizar la extracción de ADN de plásmido mediante el método de extracción de Weising, *et al.* (1995), modificado por el CIP- Quito. El ADN purificado fue enviado a MacroGen Inc. (Corea) para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas en la base de datos del NCBI con el programa BLAST para su identificación. Con los datos obtenidos se realizó un matriz binaria de presencia o ausencia para un análisis de coordenadas principales (PCO) 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).

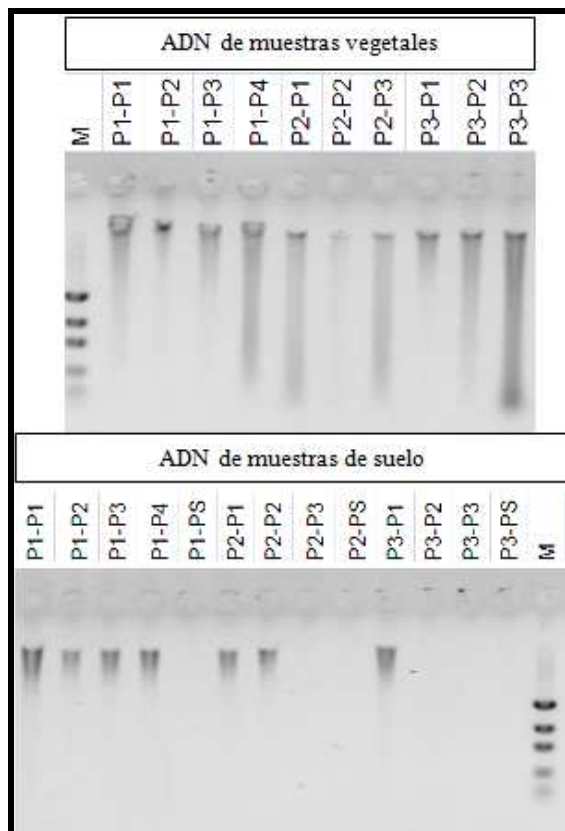


Figura 3. ADN genómico de muestras vegetales y de suelo de las plantaciones 1,2 y3 de Santo Domingo de los Tsáchilas. Marcador de peso molecular: Low Mass Ladder INVITROGEN.

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).

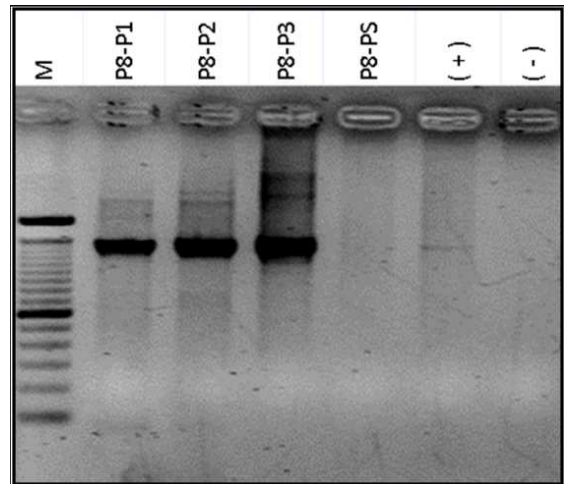


Figura 4. Detección de fitoplasma asociado con ML en muestras de Palmar del Río en Orellana. Marcador de talla (100bp). Carriles P8-P1, P8-P2 y P8-P3 3: plantas sintomáticas, P8-PS: Planta asintomática. Carriles 6 y 7: control positivo y negativo.

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.

Al realizar la secuenciación de los fragmentos de detección se pudo verificar que los fitoplasmas encontrados son los mismos que se reportan en Colombia como los agentes causales de la Marchitez Letal (AY739023.1). Como se muestra en la Tabla 1, el e-value para la mayoría de los alineamientos es 0 lo que indica que estos han sido realizados al azar y que las secuencias son probablemente las mismas.

Tabla 1. Alineamiento de secuencias en BLAST con la secuencia del fitoplasma causante de la Marchitez Letal disponible en la base de datos del NCBI

Muestra	Query coverage	E-value	Max ID
Control C2	88%	0	92%
Enferma plantación 1	65%	0	88%
Enferma plantación 2	67%	2E-96	75%
Enferma plantación 4	80%	2E-180	77%
Enferma plantación 6	84%	0	87%
Enferma plantación 7	66%	0	82%
Enferma plantación 8	78%	0	85%

Esto se valida con los resultados obtenidos en los alineamientos obtenidos en el programa LALIGN, el cual usa una matriz de sustitución PAM120 que toma en cuenta mutaciones y evolución, con lo que todas los alineamientos presentan un e-value de -1 como se muestra en la Tabla 2, lo que significa que todas las secuencias encontradas son iguales a la reportada en Colombia.

Tabla 2. Alineamiento de secuencias en LALIGN con la secuencia del fitoplasma causante de la Marchitez Letal disponible en la base de datos del NCBI.

Muestra	E-value	Max ID
Control C2	-1	91,5
Enferma plantación 1	-1	77
Enferma plantación 2	-1	64,2
Enferma plantación 4	-1	72,2
Enferma plantación 6	0	86,9
Enferma plantación 7	-1	73,2
Enferma plantación 8	-1	80,1

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*. También se destacan microorganismos conocidos como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Mycobacterium*, *Rhizobium* y *Clostridium* en menores cantidades.

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).

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.

F. Análisis metagenómico de muestras vegetales

De las 96 muestras enviadas a MACROGEN, sólo 50 de ellas fueron secuencias de buena calidad $QV \geq 20$, cumpliendo con el tamaño esperado del amplicón, las demás no tenían una buena longitud ya que se encontraban por debajo de las 100 pb y en los electroferogramas se observó la presencia de solapamientos en los picos, lo cual no permite una lectura confiable de la secuencia.

Se analizaron todas las secuencias en la base de datos del NCBI mediante el algoritmo BLAST para obtener la identidad de las secuencias mediante alineamientos. De aquellas muestras que no poseían una buena calidad no se obtuvieron alineamientos y en la tabla 3 se presentan los datos de los alineamientos obtenidos con las demás secuencias, todos corresponden a microorganismos incultivables, es decir que se han encontrado mediante metagenómica en muestras de origen ambiental u otros.

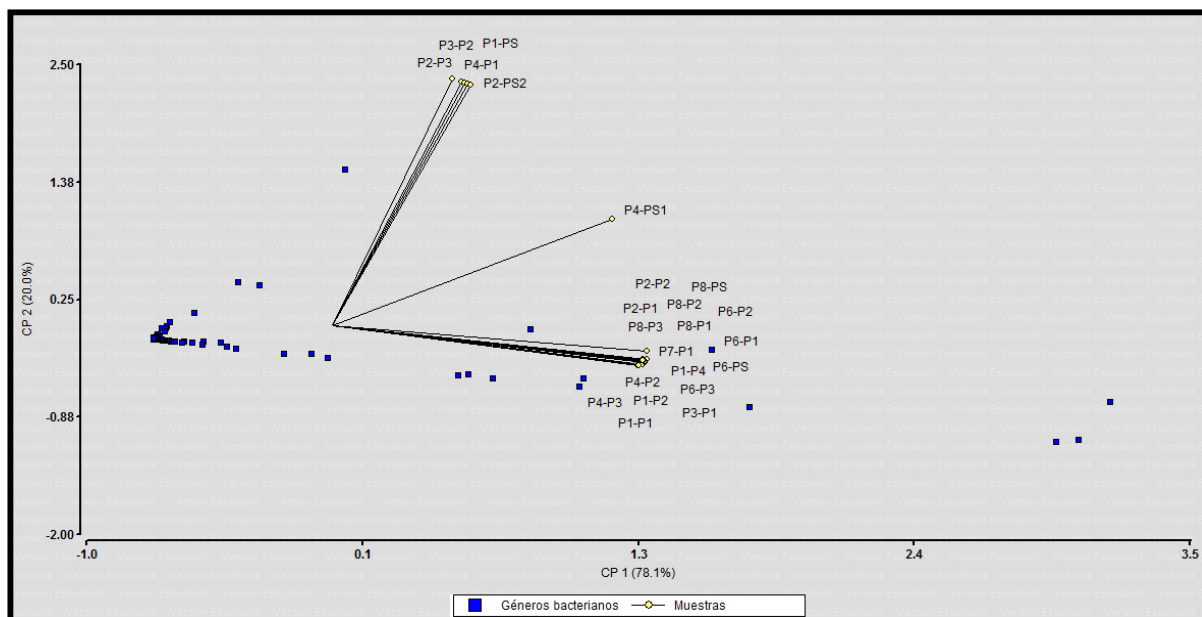


Figura 5. Análisis de componentes principales (ACP) con los datos de diversidad metagenómica de suelo, realizado en el programa InfoStat v.2011e .

Tabla 3. Microorganismos endógenos identificados en la base de datos BLAST

Bacterias identificadas	No. Accesoión GenBank
<i>Uncultured bacterium clone R16</i>	JX523245.1
<i>Uncultured bacterium clone RMAL28</i>	JF681639.1
<i>Uncultured bacterium clone FFCH13347</i>	EU133393.1
<i>Uncultured bacterium clone FL11e10_16137</i>	JQ374597.2
<i>Uncultured cyanobacterium clone B10M65A</i>	DQ979069.1
<i>Uncultured bacterium clone R4</i>	JX523235.1
<i>Uncultured bacterium clone N102B_210</i>	GU940692.1
<i>Uncultured bacterium clone PM1t2_a03c09</i>	GQ491732.1
<i>Uncultured organism clone ELU0068-T458-S-NIPCRAMgANa_000279</i>	HQ771590.1
<i>Uncultured bacterium clone Munt_1_B12</i>	HE857721.1
<i>Uncultured Flavobacteriaceae bacterium clone LW9m-6-90</i>	EU640469.1
<i>Uncultured bacterium clone HDB_SIOZ583</i>	HM186785.1
<i>Uncultured bacterium clone SG1-3916S</i>	AY135867.1
<i>Pantoea sp. CZS-2</i>	JX873957.1

En la Figura 6 se encuentra representado el PCO y no se observa una relación de la presencia o ausencia de los microorganismos identificados con la ML. Con esta información se observa que los la mayoría de microorganismos se encuentran presentes tanto en muestras de plantas sintomáticas como asintomáticas, por lo tanto no se puede definir una relación de los mismos con la ML.

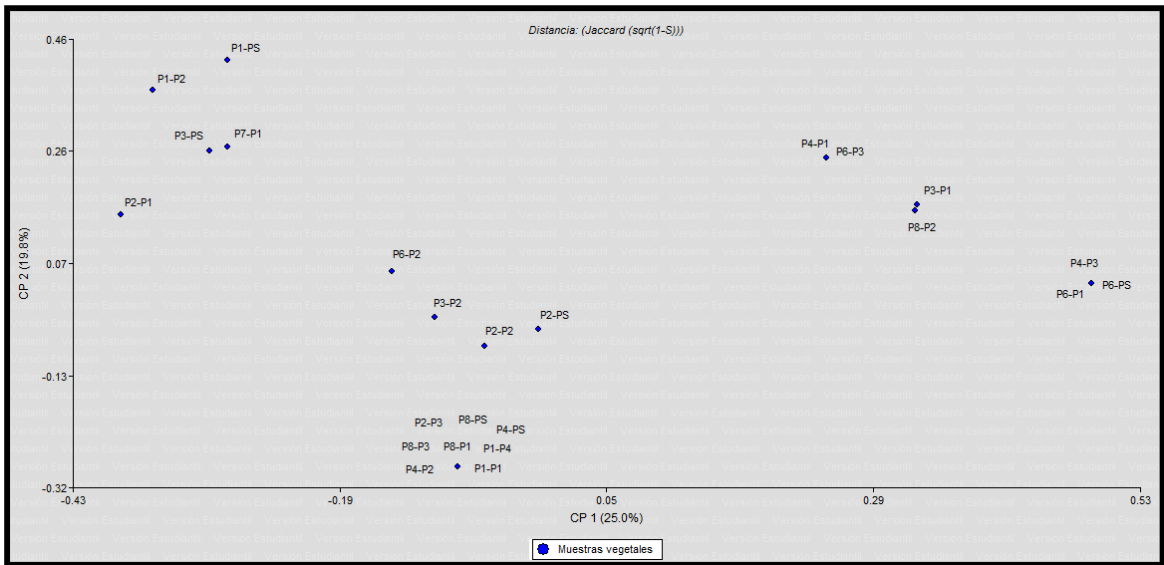


Figura 6. Análisis de coordenadas principales (PCO) con los datos de diversidad metagenómica de muestras vegetales, realizado en el programa InfoStat v.2011e .

IV. CONCLUSIONES

- Se detectaron fitoplasmas en 18 de los 20 casos de plantas con sintomatología de Marchitez letal y se comprobó que en plantas asintomáticas no se registra la presencia de fitoplasmas.
- Se determinó que los fitoplasmas encontrados en las plantaciones muestreadas probablemente son los mismos que se detectaron como causante de la Marchitez Letal en Colombia ya que las secuencias comparadas con la base de datos del NCBI son muy similares.
- La diversidad microbiana detectada en plantas sanas y enfermas no tiene una relación directa con la Marchitez Letal, indicando que la enfermedad no es causada por un factor biótico del suelo.
- Con la información obtenida de la diversidad bacteriana presente en tejidos afectados con Marchitez letal y sanos mediante bioinformática no se puede llegar a una conclusión de que esta diversidad se encuentre relacionada con la enfermedad.

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.