

Agente causal de la marchitez letal en plantaciones comerciales de palma aceitera en el Ecuador

Baer, Natasha ^a - Morillo, Eduardo ^b - Bernal, Gustavo ^{c*}

^a Universidad de las Fuerzas Armadas. Escuela Politécnica del Ejército. Av. Gral. Rumiñahui s/n Sangolquí – Ecuador.

^b Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
Departamento de Biotecnología. Panamericana Sur km 1, Quito-Ecuador.

^c Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA-CIPAL). km 37.5 vía Santo Domingo-Quinindé, Ecuador.

Recibido: 22/12/2014

Revisado: 02/02/2015

Aceptado: 09/02/2015

RESUMEN

La Marchitez Letal (ML) es un problema fitosanitario que afecta al cultivo de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.), 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 la detección molecular del fitoplasma con el fin de monitorear su presencia en plantaciones comerciales de La Concordia y Orellana (Ecuador). La detección del fitoplasma se realizó utilizando primers específicos 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. 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. 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. 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: Fitoplasma, marchitez letal, metagenómica, palma aceitera.

ABSTRACT

The lethal wilt (ML) is a sanitary problem that affects oil palm crop (*Elaeis guineensis* Jacq.), whose symptoms have been reported to be associated with the presence of a phytoplasma transmitted by the hemipteran *Myndus crudus*. Although symptoms of ML in oil palm commercial

plantations in Ecuador suggest the disease incidence, the presence of this pathogen has not been demonstrated. In this research, it was validated the molecular detection of phytoplasma in order to monitor its presence in commercial plantations of La Concordia and Orellana (Ecuador). The phytoplasma detection was performed using specific primers from the spacer region of the 16S and 23S genes, applying the Nested-PCR reaction with the combination of P1F-P7R and R16mF2-R16mR1 primers. On the other hand, microbial diversity was analyzed using soil metagenomic technique, to determine any association with the incidence of the disease. For monitoring of commercial plantations, 20 plants with symptoms of ML in seven plantations were analyzed, where it was detected the presence of phytoplasma in 16 cases, and in any case in healthy plants DNA, sampled in the same plantations. Soil metagenomic analysis was performed for 16 positive cases and eight negative cases, showing that there is no variation associated with microbial diversity among plants with symptoms of ML and healthy plants.

Keywords: Lethal wilt, metagenomics, oil palm, phytoplasma.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de aceite de palma (*Elaeis guineensis* Jacq.) 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. (Ayala, 2008)

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.

* Correspondencia a: Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA - CIPAL). Km 37.5 vía Santo Domingo - Quinindé - Ecuador. Teléfono: +593 2245 9766.

Correo electrónico: gbernal@ancupa.com

Inicialmente se registró en híbridos intraespecíficos de *E. guineensis* y recientemente en híbridos interespecíficos *E. guineensis* x *E. oleifera*. En Colombia se han erradicado más de 50 000 plantas afectadas, abarcando una extensión aproximada de 800 ha de distintas plantaciones. (Gutiérrez, 2008)

En el Ecuador la enfermedad ya se registró en el 2006, en la zona de San Lorenzo, extendiéndose a Santo Domingo, La Concordia, Quevedo y Orellana, y produciendo la pérdida total de aproximadamente 200 ha 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. (Rocha et al., 2007)

La enfermedad se presenta tanto en plantas jóvenes como en plantas adultas, comúnmente entre los tres y cuatro años, época en que el cultivo empieza a producir. 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. (Rocha et al., 2007)



Fig. 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 Gutiérrez (2008) concluye que el patógeno es de carácter sistémico y letal.

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. (Gutiérrez, 2008)



Fig. 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 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en el 2006, mediante técnicas moleculares se detectó 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. (Rocha et al., 2007)

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 que permiten identificar a todos los microorganismos encontrados en un nicho ecológico, sea este suelo, agua (ríos y mares) y hasta en organismos vivos (Daniel, 2005). En relación a la identificación de un agente causal de enfermedades, la metagenómica es una novedosa y prometedora metodología, que permite analizar genomas de microorganismos que no pueden ser cultivados, y es por lo tanto una estrategia utilizada en esta investigación.

Con estos antecedentes, la Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA), el Departamento de Biotecnología del INIAP y la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), llevaron en conjunto un estudio con el propósito principal de detectar el agente causal de la Marchitez Letal en palma aceitera en el Ecuador, utilizando técnicas moleculares.

Los objetivos del estudio, fueron: a) Determinar la presencia del fitoplasma asociado con la ML en plantaciones comerciales de palma en Ecuador a través de la validación de un método de detección molecular, y b) Inventariar la diversidad microbiana existente en muestras de suelo de plantas con ML con el fin de determinar la existencia de otros microorganismos potencialmente relacionados.

II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADN: Se obtuvo buena calidad de ADN tanto a partir de muestras vegetales como de suelo. Los rendimientos promedio obtenidos fueron de 2.6 μg y 1.5 μg respectivamente (Tabla I).

Detección de fitoplasmas: En 16 de 20 muestras con sintomatología de ML, se obtuvo amplificación del fragmento asociado con la presencia del fitoplasma, mientras que en ninguna de las plantas sanas se obtuvo el amplicón (Figura 3).

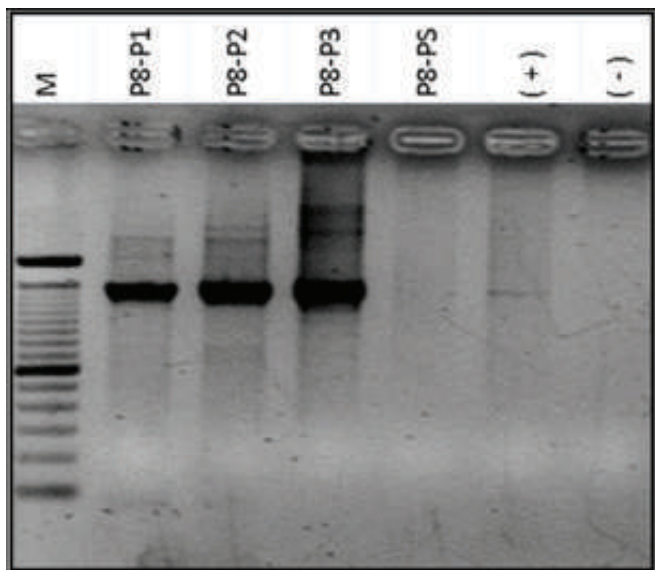


Fig. 3. Detección de fitoplasma asociado con ML en muestras de Palmar del Rio en Orellana. Marcador de talla (100bp). Carriles P8-P1, P8-P2 y P8-P3 3: plantas enfermas, P8-PS: Planta sin síntomas de ML. Carriles 6 y 7: control positivo y negativo.

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 Análisis PCA de la diversidad cualitativa y cuantitativa de diversidad metagenómica 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.

TABLA I
RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE ADN Y LA DETECCIÓN DEL FITOPLASMA PROCEDENTE DE LAS MUESTRAS COLECTADAS

Código	Muestra vegetal		Muestra de suelo		Amplificación fitoplasmas
	Concentración ADN (ng/ μl)	Rendimiento total (ng)	Concentración ADN (ng/ μl)	Rendimiento total (ng)	
P1-P1	146.8	7340	74.4	3720	✓
P1-P2	95.6	4780	28.5	1424	✓
P1-P3	67.2	3360	40.4	2020	
P1-P4	106	5300	47.6	2380	✓
P1-PS	34.7	1734	10	500	
P2-P1	61.6	3080	32.8	1642	✓
P2-P2	14.2	712	28.8	1440	✓
P2-P3	46	2300	10	500	✓
P2-PS	51.6	2580	10	500	
P3-P1	38.9	1944	10	500	✓
P3-P2	63.2	3160	10	500	✓
P3-P3	186.8	9340	10	500	
P3-PS2	64.8	3240	10	500	
P3-PS3	186	9300	10	500	
P4-P1	11.2	558	24.4	1220	✓
P4-P2	13.4	668	15.6	780	✓
P4-P3	29.4	1468	10	500	✓
P4-PS1	39.8	1990	10	500	
P4-PS2	46	2300	10	500	
P6-P1	29.4	1470	68.4	3420	✓
P6-P2	25.9	1296	47.6	2380	✓
P6-P3	21.5	1074	73.2	3660	✓
P6-PS	10	500	69.6	3480	
P7-P1	49.2	2460	20	1000	✓
P7-PS	10	500	27.4	1370	
P8-P1	16.4	820	28.7	1434	✓
P8-P2	22.3	1116	57.6	2880	✓
P8-P3	36.8	1838	64.8	3240	✓
P8-PS	10	500	44	2200	
Promedio	52.9	2645.8	31.2	1558.3	

Con estos resultados, 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.

El análisis metagenómico de suelo no aportó la posible identificación de otros agentes microbianos relacionados con la ML (Figura 4). Este resultado corrobora al momento la hipótesis de la causalidad del fitoplasma en ML, de acuerdo a lo reportado por Álvarez (2006), 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.

III. CONCLUSIONES

La técnica de detección molecular del fitoplasma asociado con la Marchitez Letal puede considerarse como un servicio al alcance del sector palmicultor del país, para la detección precisa de la enfermedad.

Se confirmó la presencia del fitoplasma asociado con ML en plantaciones comerciales de palma en el Ecuador.

No existen diferencias en la diversidad microbiana de suelo de plantas enfermas y sanas de Marchitez Letal, lo que indica que la enfermedad no está asociada con un factor biótico del suelo.

V. METODOLOGÍA

Colección de muestras: En cuatro plantaciones de la zona de Santo Domingo de los Tsáchilas y una de la provincia de Orellana, se tomaron muestras de tejido vegetal de 20 plantas sintomáticas y 9 asintomáticas de ML. La muestra consistió en 5 gramos de tejido procedente del estipe de la planta, enfocando la zona de haces vasculares. Se colectaron además 10 gramos de suelo de la rizósfera de cada una de las plantas muestreadas.

Extracción de ADN: Se procesaron las muestras de palmas procedentes de las 20 plantas sintomáticas y 9 asintomáticas. 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).

Detección de fitoplasmas: Se utilizaron cebadores reportados por Smart (1996) y Álvarez (2006). 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, dando como resultado un amplicón de 1430 pb en las muestras positivas para ML. Una vez estandarizada la detección, se realizó un barrido en todas las muestras de ADN obtenidas de las muestras vegetales del muestreo.

Análisis metagenómico: Para los casos positivos para fitoplasma se realizó la secuenciación de la región V5

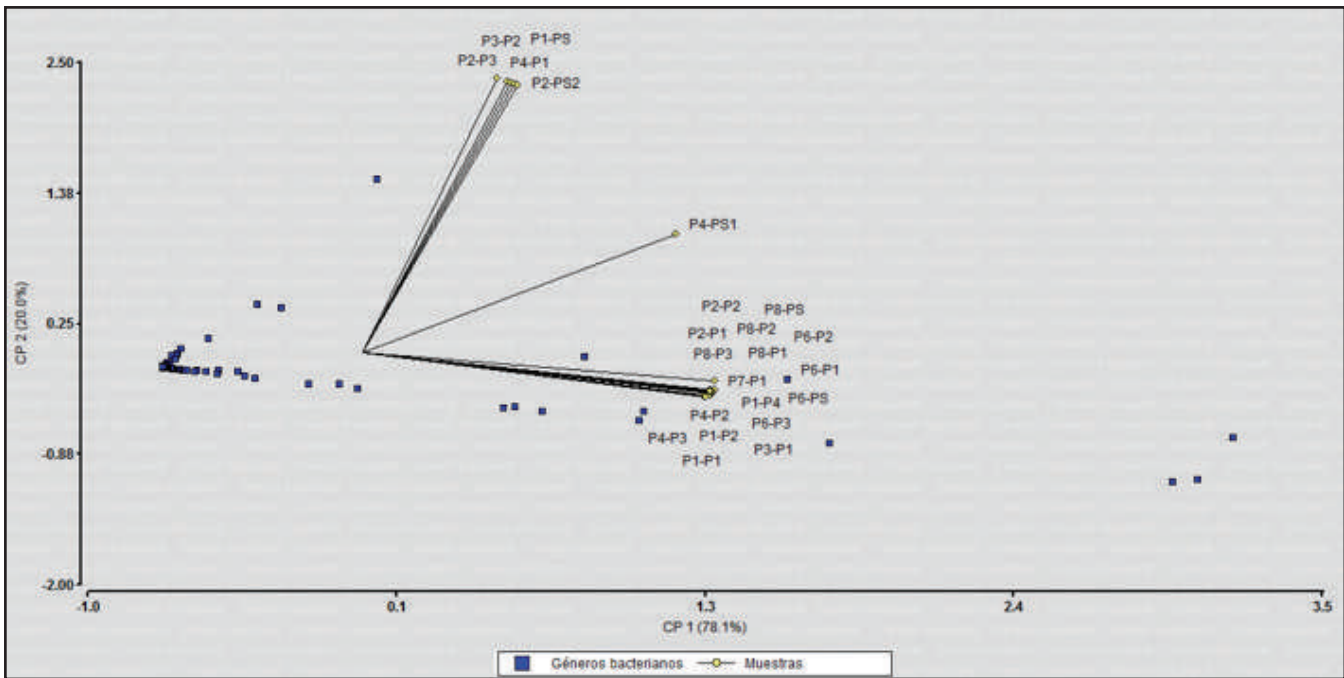


Fig. 4. Análisis de Componentes Principales (ACP) para datos cuantitativos de diversidad microbiana en muestras de suelo, realizado en el programa Infostat v. 2011e.

(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 Estados Unidos, para su pirosecuenciación.

Con los resultados obtenidos del análisis metagenómico se realizó un Análisis Multivariado de Componentes Principales (ACP) utilizando el programa estadístico NTSYS ver.2.0.

REFERENCIAS

E. Álvarez, "DNA Sequence Analysis of the 16S rRNA region of Phytoplasma associated with lethal wilt in oil palm", *Fitopatología Colombiana* vol. 29, No. 1, p. 39-44, 2006.

E. Ayala, *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, Econestad, p. 15-16, 2008.

D. Gutiérrez, "La Marchitez letal de la Palma de Aceite", Grupo Upía, Cas., Colombia, Informe estado del arte, 2008.

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

R. Daniel, "The Metagenomics of Soil", *Nat. Rev. Microbiol.* vol. 3, no. 6, p. 470-478, 2005.

C. D. Smart, B. Schneider, C. L. Blomquist, L. J. Guerra, N. A. Harrison, U. Ahrens, K. H. Lorenz, E. Seemüller, B. C. Kirkpatrick, "Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23S rRNA spacer region", *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 62 no. 8, p. 2988-2993, 1996.