

Notas del Director

El cultivo comercial de la palma africana en Colombia es un cultivo colonizador, y como tal, está expuesto a condiciones nuevas, no solamente edafoclimáticas, sino también a las producidas por la gran biodiversidad de insectos y microorganismos que existen en el medio colombiano.

En la medida que se ha ampliado el área del cultivo y se ha intensificado su manejo para aumentar la productividad, se ha fortalecido la presencia de insectos y microorganismos nuevos, que en muchos casos se han convertido en plagas de importancia económica para el gremio.

Un ejemplo de dicho aumento es el caso de la llamada Marchitez Letal, que se detectó a mediados de la década de 1990 y de la cual Cenipalma inició la investigación para encontrar un agente causal en el año 2002.

Se han estudiado varias hipótesis. Una de las estudiadas, y que se presenta en este Ceniavances, es el de la bacteria *Xylella fastidiosa*, bien conocida por producir grandes daños económicos en cultivos como la uva y los cítricos. Los resultados muestran que *Xylella fastidiosa* no está presente en los tejidos enfermos ni sanos.

El trabajo lo desarrolló Cenipalma con el apoyo del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de Los Andes (Lamfua).

PEDRO LEÓN GÓMEZ CUERVO
Director Ejecutivo

Xylella fastidiosa se detecta en tejidos de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) afectada por marchitez letal



por Cenipalma descartaron a *F. oxysporum* como agente causal de la enfermedad (Sánchez *et al.*, 2003).

Hasta el momento, no se ha identificado ningún agente causal de esta enfermedad y se han postulado nuevas hipótesis. Según la sintomatología presente en las palmas, se consideró posible la presencia de la bacteria fitopatógena *Xylella fastidiosa*. Este microorganismo es una bacteria Gram negativa limitada al xilema de las plantas, que se transmite a través de insectos pertenecientes a la familia Cercopidae, subfamilia Cicadellinae, que se alimentan del xilema. *X. fastidiosa* se ha asociado a disturbios tales como la Enfermedad de Pierce de la Uva, Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) y Enanismo de la Soca (Agris, 2005), entre otros. Sin embargo, no se ha reportado asociada a enfermedad alguna en palma de aceite. No obstante, dentro de las hipótesis de trabajo de Cenipalma, se consideró importante evaluar, mediante técnicas moleculares, la presencia o ausencia de *X. fastidiosa* en distintos tejidos de palmas de aceite sana y afectada por marchitez letal.

Introducción

El marchitez letal es una enfermedad aparecida a mediados de la década de 1990, en la Zona Oriental palmera de Colombia. Esta enfermedad ha afectado varias plantaciones y es responsable de cuantiosas pérdidas para el sector. Se han adelantado variedad de experimentos encaminados a identificar el agente causal y desarrollar estrategias para el manejo de la enfermedad (Airedo, 2002). Los síntomas externos originalmente reportados en las palmas afectadas incluían el amarillamiento de las hojas, la pudrición de racimos y el necrosamiento de haces vasculares, por lo cual se consideró que el "nuevo disturbio" era similar a enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum*. Sin embargo, experimentos realizados

Metodología

Muestreo

El material vegetal fue obtenido de la plantación Palmas del Casanare (Villanueva). Se

muestrearon raíces, folíolos, raquis y aserrín del estípite obtenidos de palmas sanas y afectadas por marchitez letal. En total se muestrearon dos palmas sanas y diez palmas enfermas. Los tejidos recolectados fueron empacados en bolsas plásticas y transportados vía terrestre, a temperatura ambiente, hasta el Laboratorio de Caracterización Molecular de Cenipalma (LCM, Bogotá). El material fue pulverizado con nitrógeno líquido y almacenado a -70°C hasta su uso.

Extracción de ADN

El ADN de cada uno de los tejidos muestreados por cada palma fue extraído empleando el protocolo establecido por el LCM, con algunas modificaciones. Brevemente, 500 mg de cada uno de los tejidos pulverizados se incubaron a 65°C , durante 30 minutos, con 1,5 ml de solución de extracción (Tris-HCl 150 mM, EDTA 15 mM; NaCl 1M; CTAB 1% p/v; PVP 360.000 1% p/v; PVP 40.000 2% p/v y b-mercaptoetanol 5% v/v). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a $12500\times g$ durante 20 min. El sobrenadante se trató con un volumen de fenol equilibrado a pH 8,0. La mezcla se centrifugó a $12500\times g$ durante 15 min. Luego a la fase acuosa superior se adicionaron 1,5 volúmenes de cloroformo:octanol (2:1 v/v) y se agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a $12500\times g$ durante 15 min. La fase acuosa fue tratada con un volumen de cloroformo y agitada durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a $12500\times g$ durante 15 min. Para precipitar el ADN, el sobrenadante fue suplementado con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y un volumen de isopropanol frío (-20°C). La mezcla se agitó por inversión y se incubó toda la noche a -20°C . Al día siguiente, se centrifugó a $25000\times g$ durante 15 min. El botón de ADN fue lavado con 1 ml de etanol 70%, se centrifugó nuevamente a $15000\times g$ durante 3 min. y el etanol residual fue completamente removido. El ADN fue resuspendido en 20 μl de TE-ARNasa e incubado a 37°C durante 30 min. La calidad del ADN resultante fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa.



Amplificación de regiones específicas

El gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando cebadores específicos para eubacterias (Rodríguez *et al.*, 2003; Tabla 1). La reacción de amplificación (25 μl) contenía: Solución tampón PCR 1X, MgCl_2 1,5 mM; dNTPs 200 μM ; 0,2 μM de cada cebador, 1,0 U de *Taq* DNA polimerasa y 1 μl de ADN (aprox. 50 ng). Las condiciones de amplificación fueron como siguen: Desnaturalización inicial a 94°C , durante 3 min., seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, alineamiento de cebadores a $54,5^{\circ}\text{C}$ durante 30s; extensión a 72°C durante 1 min. y extensión final durante 7 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó como control positivo ADN de *X. fastidiosa*.

Tabla 1. Cebadores utilizados en este estudio

Cebador	Secuencia (5'-3')	Longitud en bases	Posición	Referencia
FD1 Eubacterial	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	20	8-28*	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003
RD1 Eubacterial	AAG GAG GTG ATC CAC CC	17	1526-1542	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003
S-S-X.fas-0067-a-S-19	CGG CAG CAG ATT GGT AGT A	19	67-85*	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003
S-S-X.fas-0838-a-A-21	CGA TAG TGA GTG CGA ATT TGG	21	838-858*	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003
S-S-X.fas-1439-a-A-19	CTC CTC GGS GTT AAG CTA C	19	1439-1457	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003
272-2-int	GCC GCT TCG GAG AGC ATT CCT	21	N.D.	Pooler y Harving, 1995
CVC-1	AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA	21	N.D.	Pooler y Harving, 1995

* Las Posiciones corresponden al gen 16S ARN de *E.coli*
 NO: No Determinada para este estudio

Resultados

Extracción de ADN

Se obtuvo ADN de las muestras de tejido sano y enfermo de palma que fue amplificable con los cebadores evaluados. La calidad del ADN fue aceptable; sin embargo, se presentó degradación rápida de esta molécula para tejidos provenientes de raíces y aserrín de estípite.

PCR Especifica

Se tomaron muestras de ADN que no presentaron degradación para realizar la amplificación con los cebadores universales FD-1 y RD-1. Se realizaron diluciones de las muestras de ADN extraídas de palma enferma y de las muestras de *X. fastidiosa*, las cuales fueron usadas como molde en la PCR. En todos los ensayos, en el control positivo (ADN de *X. fastidiosa*) se obtuvo una banda de 1.348 pb con los cebadores S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas-1439-a-A-19 (Fig. 1); otra banda de 745 pb con los cebadores S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas-0838-a-A-21 (Fig. 1 y 2) y una banda de aproximadamente 1.000 pb con los cebadores CVC-1 y 272-2-int (Fig. 2). Se obtuvo amplificación de varias bandas en la muestra de aserrín tanto en plantas sanas como en plantas sintomáticas.

Para determinar la procedencia o significancia de las bandas obtenidas en el material vegetal con el par de cebadores S-S-X.fas-0067-a-

S-19 y S-S-X.fas-0838-a-A-21, se decidió realizar un segundo ensayo con aserrín de plantas sintomáticas y asintomáticas (Fig. 1) y de otras muestras vegetales de plantas sintomáticas (Fig. 2). Sólo se observó amplificación clara en los controles positivos y ciertas amplificaciones inespecíficas (que no corresponden a los tamaños reportados para el gen) en algunas muestras.

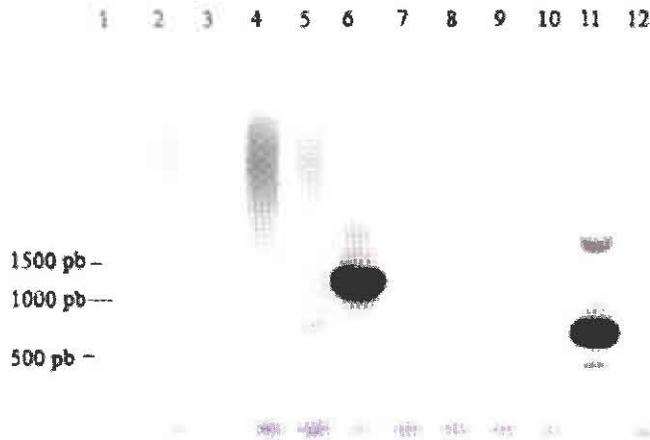


Figura 1: PCR a partir de ADN de aserrín y muestras de *Xylella fastidiosa*. 1. Marcador 100 pb. Cebadores S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas 1439-a-A-19 del carril 2 al 7. Carril 2. Aserrín, 3 (Sin muestra), 4. Aserrín planta asintomática, 5. Aserrín de planta con síntomas, 6. Control *X. fastidiosa*, 7. Control sin muestra, Cebadores S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas-0838-a-A-21 del carril 8 al 12. Carril 8. Aserrín planta con síntomas, 9. Aserrín planta asintomática, 10. Aserrín planta con síntomas, 11. Control *X. fastidiosa*, 12. Control sin muestra.

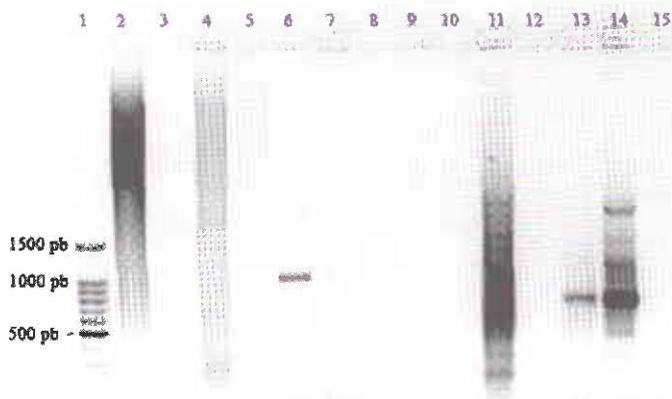


Figura 2: PCR a partir de ADN de palma enferma lote 10 y muestras de *Xylella fastidiosa*. 1. Marcador 100 pb. Cebadores CVC-1 y 272 2-int del carril 2 al 8. Carril 2. Hoja, 3. Raíz, 4. Aserrín, 5. Estípote, 6. Control *X. fastidiosa*, 7. Control *X. fastidiosa* (dilución), 8. Control sin muestra. Primers S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas-0838-a-A-21 del carril 9 al 15. Carril 9. Hoja, 10. Raíz, 11. Aserrín, 12. Estípote, 13. Control *X. fastidiosa*, 14. Control *X. fastidiosa*, 15. Control negativo sin muestra.

La calidad del ADN se garantizó mediante la amplificación de alelos microsatélites en muestras provenientes de tejidos sanos y enfermos (Fig. 3) siguiendo la metodología propuesta por Rocha *et al.* 2005).

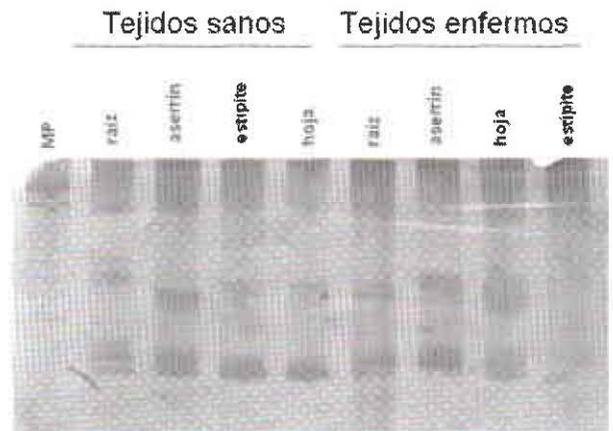


Figura 3. Amplificación de microsatélites con ADN de tejidos obtenidos de muestras sanas y enfermas

Adicionalmente, para comprobar la ausencia de inhibidores de la PCR en las muestras de ADN extraídas de palma enferma se realizó una mezcla de las cuatro extracciones de ADN realizadas: folíolos, raíces, raquis y aserrín del estípote en proporción 1:1:1:1. Luego, los ADN se mezclaron con el ADN de *X. fastidiosa* en proporciones 1:1, 4:1 y 1:4 (ADN palma: *X. fastidiosa*). El PCR se realizó con los cebadores S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas-0838-a-A-21 que amplifican una banda para *X. fastidiosa* de aproximadamente 745 pb (Fig.4).

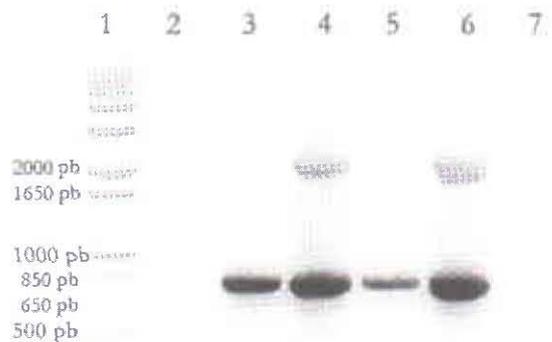


Figura 4. Electroforegrama de los productos de PCR generados a partir de ADN de palma enferma lote 10 y muestras de *X. fastidiosa*. 1. Marcador de peso molecular. Cebadores S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas-0838-a-A-21 del carril 2 al 7. Carril 2. Mezcla de ADN palma, 3. ADN de palma y de *X. fastidiosa* 1:1, 4. Control *X. fastidiosa*, 5. ADN de palma y de *X. fastidiosa* 4:1, 6. ADN de palma y *X. fastidiosa* 1:4, 7. Control sin muestra

No hubo amplificación de las muestras de palma enferma al igual que en el control negativo (Fig. 4). Se observó, en las muestras que contenían ADN de *X. fastidiosa*, una banda intensa del tamaño esperado. En conclusión, se descarta la posibilidad de inhibidores de la reacción de PCR presentes en las muestras de ADN de palma enferma.

Conclusiones

Las bandas obtenidas en los controles positivos (*X. fastidiosa*) corresponden al tamaño de las esperadas según la literatura (Rodrigues *et al.*, 2003) (Fig. 1 a 5). No se obtuvieron amplificaciones en las muestras de tejido enfermo de palma con los cebadores S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas-1439-a-A-19 ni con CVC-1 y 272-2-int (Fig. 2). Se observaron bandas inespecíficas (tamaños no esperados) en las muestras de aserrín con los cebadores S-S-X.fas-0067-a-S-19 y S-S-X.fas-0838-a-A-21 (Fig. 1). Sin embargo, estas bandas se presentaron tanto en tejidos enfermos como en sanos y no se obtuvieron cuando la temperatura de alineamiento aumentó ni cuando se usaron productos como DMSO y BSA. Se puede concluir que la presencia de tales bandas en la muestra fueron artefactos de la amplificación y no corresponden a bandas específicas de la bacteria objeto de estudio. Así mismo, experimentos de amplificación específica sobre tejidos de palmas enfermas y mezclas de ADN de palma con ADN bacteriano, permitieron descartar la presencia de inhibidores de PCR.

Los resultados obtenidos permiten concluir que *X. fastidiosa* no está presente en tejidos de palma de aceite sanos ni afectados por marchitez letal. En consecuencia, se descarta esta hipótesis de trabajo.

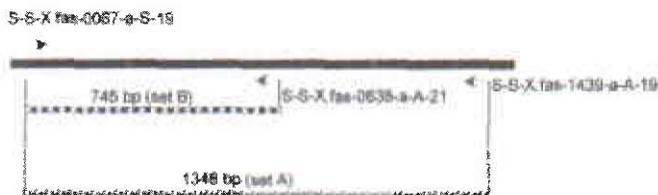


Figura 5: Esquema de la posición relativa del 16S rRNA de los cebadores específicos para la región 16S del ARNr de *X. fastidiosa* (tomado de Rodrigues *et al.*, 2003).

Agradecimientos

Los autores agradecen a Juan Pablo Tovar y Edwin Navia (Cenipalma) por la realización de los muestreos y la recolección del material vegetal. A la plantación Palmas del Casanare por su colaboración. A la doctora Elena Paola González Jaimes (Docente Facultad de Ciencias

Agrarias Politécnico Colombiano JIC, Medellín) por la gestión para la consecución del ADN de *X. fastidiosa* y por su valiosa información. Al doctor Pedro León Gómez Cuervo y al Comité de Publicaciones de Cenipalma por la crítica a este manuscrito. La investigación de Cenipalma es financiada por el Fondo de Fomento Palmero, administrado por Fedepalma.

Referencias

Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Elsevier Academic Press.

Airede, C. 2002. Análisis del "nuevo disturbio" de la palma de aceite presente en la Zona Oriental. Rocha, PJ. (traductor). Ceniavances (Colombia) 100:1-3.

Pooler, MR; Hartung, JS. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Current Microbiology 31, 377-381.

Rocha PJ; Rojas Y; Rey, L. 2005. Caracterización molecular preliminar del banco de germoplasma de *Elaeis oleifera* [H.B.K.] Cortéz, mediante microsatélites. Ceniavances (Colombia), 130:1-4. ISSN: 0123-8353.

Rodrigues, JLM; Silva-Stenico, ME; Gomes, JE; Lopes JRS; Tsai SM. 2003. Detection and Diversity Assessment of *Xylella fastidiosa* in Field-Collected Plant and Insect Samples by using 16S rRNA and *gyrB* Sequences. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4249-4255.

Sánchez, NJ; Fuentes, FR; Torres, M.; Rocha, PJ; Calvache, H; Gómez, PL. 2003. La marchitez letal no es la marchitez vascular africana causada por *Fusarium*. Palmas (Colombia) 24(4):9-20. ISSN: 0121-2923.

cenipalma

Director: Pedro León Gómez Cuervo
 Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma
 Coordinación editorial: Oficina de Prensa
 Diseño y diagramación: Briceño Gráfico
 Impresión: Molher Ltda. Impresores

Esta publicación contó con el apoyo del Fondo de Fomento Palmero