

Determinación de las condiciones óptimas para la detección y cuantificación de *Ganoderma* sp. en palma de aceite usando PCR cuantitativo en tiempo real

Mónica Navia¹, Hernán Mauricio Romero^{1,2*}

Notas del Director

Los problemas fitosanitarios del cultivo de la palma de aceite en Colombia siguen siendo la prioridad del sector y también del Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma.

Estos problemas se abordan de manera integral, así que en la búsqueda de las soluciones para las principales enfermedades de la palma participan activamente diferentes programas, entre ellos el Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma de Aceite, con su área de Biología Molecular, con el objetivo de desarrollar herramientas moleculares para el apoyo y avance de la investigación en la sanidad del cultivo de la palma de aceite.

En esta publicación presentamos los avances de la investigación sobre la utilización de la técnica conocida como reacción en cadena de polimerasa - PCR (por su nombre en inglés) cuantitativa en tiempo real (qPCR) para la detección y cuantificación de *Ganoderma* sp., causante de la Pudrición basal del estípite (PBE).

Además de esta técnica, que ofrece mayor rapidez, precisión y sensibilidad, y permite cuantificar el patógeno, Cenipalma evalúa otras alternativas para la detección temprana de la PBE, como la determinación de tejido afectado usando tomógrafos o la cuantificación de ergosterol en palmas afectadas, métodos que han mostrado resultados promisorios.

Esto, en un mediano plazo nos permitirá ofrecer al gremio una herramienta confiable, que pueda ser implementada de forma rutinaria para la detección oportuna de la enfermedad.

José Ignacio Sanz Scovino, PhD.

Director Ejecutivo de Cenipalma

Introducción

La Pudrición basal del estípite (PBE) causada por *Ganoderma* sp. es una de las principales enfermedades de la palma de aceite. Es considerada la enfermedad más limitante en Malasia e Indonesia, ocasionando pérdidas hasta del 80% después de varios ciclos del cultivo (Chong *et al.*, 2011). La enfermedad también ha sido reportada en Angola, Camerún, República de Ghana, Nigeria, Zambia,

Santo Tomé, Príncipe, Tanzania, Zimbabue, República del Congo, Papúa Nueva Guinea, Tailandia y Honduras (Ariffin *et al.*, 2000). La PBE fue reportada inicialmente en Malasia en 1930 y el agente causal fue identificado como *G. lucidum* (W. Curt.) Karst. (Turner 1981); sin embargo, más de siete especies han sido asociadas con la enfermedad alrededor del mundo. Actualmente, la especie *G. boninense* es considerada la más patogénica y ampliamente distribuida en Malasia (Miller 1995). En Colombia, la enfermedad se reportó inicialmente en 1994 en la zona de El Copey, Cesar (Nieto 1994). Un año después, en Zona Central (Nieto 1995).

La enfermedad se propaga a través del contacto de raíces sanas con el inóculo presente en el suelo o en raíces afectadas, e involucra la degradación de lignina y celulosa durante el crecimiento del patógeno (Paterson 2007). La detección de la enfermedad se basa en la presencia de síntomas como acumulación de flechas, aparición de basidiomata en la base del estípite y raíces adventicias (Ariffin *et al.*, 2000). Infortunadamente, cuando los síntomas de la enfermedad son visibles, la mayor parte del tejido interno ya ha sido degradado, impidiendo hacer un manejo efectivo y oportuno de la enfermedad. El desarrollo de técnicas de diagnóstico temprano es entonces clave para su control. Utomo y Niepold (2000) reportaron el uso de una prueba de ELISA con anticuerpos policlonales (ELISA-Pab) como un método eficiente para detectar *Ganoderma* en tejidos de palmas afectadas por la PBE. También, algunos métodos basados en ADN usando la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) han sido desarrollados (Bridge *et al.*, 2000, Utomo y Niepold 2000). Recientemente, Modh y colaboradores (2011) reportaron la detección y cuantificación de ergosterol de *G. boninense* en palmas de aceite como un método de diagnóstico para detectar la PBE.

En la actualidad, la técnica conocida como PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) se usa para la detección y cuantificación de todo tipo de patógenos en diferentes especies vegetales. Esta técnica, introducida a finales de los 90 para detectar directamente los patógenos en el tejido vegetal, ha sido adaptada para ser usada en muchos patosistemas vegetales (Montes-Borrego *et al.*, 2011). Frente a otras técnicas convencionales, la qPCR ofrece mayor rapidez, precisión y sensibilidad, además permite cuantificar el patógeno (Babu *et al.* 2011). En esta metodología, al igual que en la PCR convencional, la presencia del patógeno es determinada por la amplificación específica de una región de su ADN, es decir, un fragmento del ADN del patógeno es copiado ("amplificado") múltiples veces (35-45 ciclos, con un crecimiento exponencial) hasta que su concentración es lo suficientemente alta para ser detectado. En muestras sanas, debido a la ausencia del patógeno, el fragmento de interés no puede ser amplificado. En la qPCR, la generación de nuevas copias ("amplicones") en cada ciclo es monitoreada a través de la emisión de fluorescencia,

¹ Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Cenipalma.

² Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.

* Autor para correspondencia, e-mail: hromero@cenipalma.org

- a medida que aumenta el número de copias del fragmento, también
- aumenta la intensidad de la fluorescencia en el tubo de la reacción.
- El ciclo en el cual la fluorescencia supera el umbral es conocido como ciclo C_p (*Crossing point*) y es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración inicial de ADN del patógeno en la muestra. De este modo, usando una curva Log concentración vs C_p es posible calcular la concentración del patógeno en muestras desconocidas. El propósito de este trabajo fue estandarizar las condiciones de reacción de la qPCR que permitieran detectar y cuantificar *Ganoderma* sp. a partir de muestras de tejido con presencia del patógeno.

Materiales y métodos

Material Vegetal y Basidiomata

Basidiomata característicos de *Ganoderma* sp. fueron colectados a partir de una palma afectada en Zona Central y de cuatro palmas de la Zona Norte (Figura 1). El tejido de palma evaluado consistió en plántulas provenientes de embriogénesis somática en condiciones *in vitro*.



Figura 1. Basidiomata colectados en Zona Central (a) y Zona Norte (b).

Extracción de ADN e identificación de los basidiomata

El tejido vegetal y los basidiomata fueron liofilizados y macerados con nitrógeno líquido. La extracción de ADN se realizó usando una modificación del protocolo de Doyle y Doyle (1990), usando 250 mg de tejido seco. El ADN obtenido se evaluó en geles de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría.

Para identificar los basidiomata colectados, las regiones ITS1, 5,8S e ITS2 del ADN ribosomal fueron amplificadas usando los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Los productos de PCR fueron purificados, clonados y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron editadas y comparadas contra la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando el programa BLAST. Secuencias de *Ganoderma* sp. asociado a palma de aceite y otros perennes disponibles en las bases de datos fueron empleadas para realizar análisis filogenéticos y confirmar la identidad de los basidiomata colectados.

Diseño de sondas y cebadores para qPCR

Con base en las secuencias de la región ITS de los basidiomata colectados y de algunas secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se diseñaron dos combinaciones de cebadores y sondas de hidrólisis, Gano y *Ganoderma*, para ser empleadas en la detección de *Ganoderma* sp. Adicionalmente, una sonda y sus cebadores fueron diseñados sobre la secuencia de la proteína 15S de la subunidad ribosomal 40S de *Elaeis guineensis* y *E. oleifera* para ser usados como control en las reacciones y descartar la presencia de inhibidores en el ADN.

Condiciones de la PCR, eficiencia de la reacción y curva de calibración

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un formato de platos de 96 pozos en un termociclador LightCycler® 480 (Roche). La detección se realizó con el software LightCycler® 480 version 1.5.0. Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas usando dos concentraciones de sondas y cebadores (0,5 μM de cada cebador más 0,3 μM y 0,3 μM de cada cebador más 0,1 μM de sonda) y evaluando 4 temperaturas de anillaje para permitir la unión del cebador al ADN molde (56, 59, 62 y 65°C). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μl , que contenía 10 μl de Master Probe (Roche), 5 μl de ADN y los volúmenes apropiados de cebadores y sonda. Las condiciones de termociclado fueron: 10 minutos a 95°C, seguidos por 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, temperatura de anillaje por 30 seg., 72°C por 8 seg., y un enfriamiento final a 40°C por 30 seg. Después de optimizar las condiciones para las combinaciones Gano y *Ganoderma*, fueron evaluadas en una reacción múltiple con la combinación *Elaeis*2.

Las diferentes condiciones de PCR se evaluaron usando diluciones seriadas de ADN del patógeno, desde 5 fg a 50 ng, las cuales se mezclaron con ADN de plántulas de cultivo *in vitro*, a una concentración de 10 ng/ μl en la mezcla final. Las muestras se evaluaron en triplicado en cada experimento. Con base en las curvas de amplificación, el software LightCycler® 480 version 1.5.0. estableció el valor C_p para cada una. Con la pendiente de la curva de calibración o curva estándar (Logaritmo de la Concentración vs C_p) se calculó la eficiencia ($E = 10^{-1/\text{pendiente}}$) de cada experimento. Las condiciones que mostraron mayor E se emplearon para construir la curva estándar.

Determinación de la relación peso seco del patógeno-cantidad de ADN

Para construir la curva biomasa/ADN se usaron mezclas de tejido de palmas sanas (plántulas cultivo *in vitro*) y basidiocarpo. Las mezclas fueron preparadas de la siguiente forma: 250 mg tejido vegetal (peso seco)/0 mg Basidiocarpo, 245/5, 240/10, 235/15, 230/20, 225/25, 200/50, 175/75, 150/100, 125/125 mg. El ADN de las mezclas de tejido se extrajo en duplicado siguiendo el protocolo previamente mencionado. El ADN se diluyó en 400 μl de 1X TE y se prepararon diluciones 1:100 y 2:100. Las diluciones fueron evaluadas por qPCR y la concentración de ADN del patógeno fue calculada con base en la curva de calibración.

Resultados

Identificación de basidiomata y evaluación de cebadores y sondas

A partir de la secuenciación de las regiones ITS de las muestras de basidiomata colectadas en campo se encontró que los cuatro basidiomata provenientes de Zona Norte tienen un porcentaje de identidad del 97-99% con la Accesoión HM138671 de *Ganoderma* sp. HKAS58053, reportada por King y Mih (2011) como una nueva especie de *Ganoderma* (*G. ryvardense*) asociada a palma de aceite en Camerún. Por su parte, el basidiocarpo colectado en la Zona Central tuvo un porcentaje de identidad del 99% con la Accesoión EU273513 descrita como *Ganoderma* sp. RV-PR10. Nilsson y colaboradores (2008), determinaron que la variabilidad intraespecífica de las regiones ITS para los basidiomicetos es de 3,33%, por lo que identidades del 97% y mayores, como las obtenidos en este estudio,

son consideradas confiables. La imposibilidad de asignar el basidiocarpo de la Zona Central a una especie específica está relacionada con una limitante del análisis BLAST. Dado que este análisis se basa en la comparación de las secuencias en estudio con las de organismos previamente caracterizados, la calidad de la consulta dependerá de la disponibilidad de secuencias de referencia en las bases de datos, por lo tanto, la carencia de secuencias de referencia de taxones idénticos o muy relacionados puede disminuir la probabilidad de tener una identificación apropiada (Kang *et al.*, 2010).

En las evaluaciones preliminares de las dos combinaciones de cebadores y sondas, *Ganoderma* y *Gano*, se observó amplificación de todas las muestras de basidiomata colectadas en campo. La combinación *Gano* mostró mayor especificidad frente a *Ganoderma* y ninguna de las muestras de palmas sanas (cultivo *in vitro*) amplificó, por lo que las demás evaluaciones se realizaron solo con la combinación *Gano*. Por su parte, la combinación *Elaeis* amplificó todas las muestras de palmas evaluadas pero ninguna de las muestras de basidiomata, ni de hongos de otras especies empleadas como controles en las reacciones.

Estandarización de la PCR y curvas de calibración

Las diluciones seriadas de ADN de *Ganoderma* fueron evaluadas bajo diferentes condiciones de PCR, obteniéndose curvas de amplificación y curvas estándar características, donde las muestras con la mayor concentración del ADN de interés tuvieron los valores Cp más bajos (Figura 2). Las pendientes y eficiencias obtenidas para cada una de las condiciones evaluadas se presentan en la Tabla 1. Debido a que la mayor eficiencia se observó al emplear una temperatura de anillaje de 59°C y las menores concentraciones de cebadores y sonda, se seleccionaron estas condiciones para construir la curva estándar definitiva. Para esto, seis diluciones intermedias (2,5 E-3 – 2,5 E2), evaluadas en triplicado, fueron analizadas en cuatro experimentos independientes. Las curvas obtenidas para cada uno de los experi-

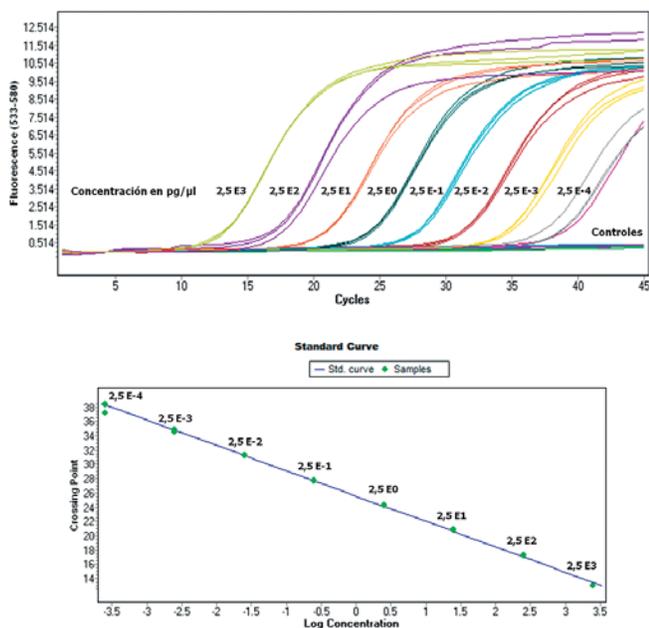


Figura 2. Curva de amplificación y curva estándar obtenida con la combinación de cebadores *Gano* para las diluciones seriadas de ADN de *Ganoderma* (concentraciones en pg/μl).

mentos se presentan en la Figura 3. Las curvas de calibración generadas a partir de los cuatro experimentos independientes mostraron la robustez y reproducibilidad del ensayo, así mismo, fue posible determinar que la prueba es muy sensible y logra detectar concentraciones muy bajas de patógeno (hasta 0,0025 pg/μl en el tubo de reacción).

Tabla 1. Resumen de la Eficiencia (E) obtenida para cada una de las condiciones evaluadas.

Temperatura de anillaje (°C)	Concentraciones de cada cebador + sonda	
	0,3 μM + 0,1 μM	0,5 μM + 0,2 μM
56	E= 1,942; P= -3,468	E = 1,947; P = -3,456
59	E= 1,957; P= -3,429	E = 1,949; P = -3,451
62	E= 1,809; P= -3,885	E = 1,815; P = -3,894
65	E= 1,682; P= -4,427	E = 1,815; P = -3,864

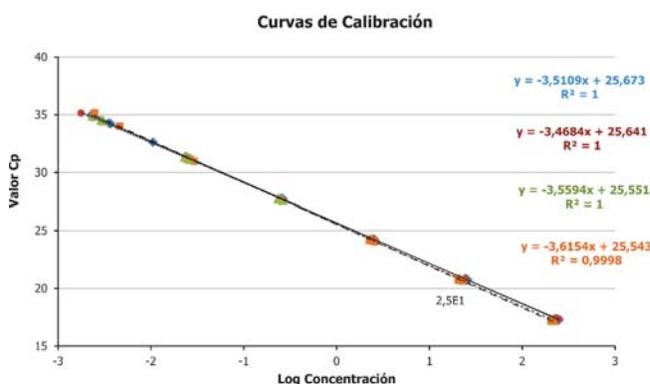


Figura 3. Curvas de calibración obtenidas en cuatro experimentos independiente usando la combinación *Gano*, con 59°C de anillaje y 0,3 μM de cada uno de los cebadores y 0,1 μM de la sonda de hidrólisis.

Determinación de la relación peso seco del patógeno-cantidad de ADN

La Figura 4 presenta la relación entre el peso seco del patógeno (mg de basidiocarpo) y la cantidad de ADN (ng) detectada a través del qPCR. Como puede observarse, a pesar de que las muestras se evaluaron en dos ensayos independientes, usando dos factores de dilución del ADN (1:100 y 2:100), las ecuaciones de las líneas de regresión de ambas curvas mostraron gran similitud en sus pendientes, demostrando la precisión del ensayo. Al usar la curva de calibración y la curva peso seco/ng de ADN es posible determinar la cantidad del patógeno (en mg de peso seco) presente en una muestra dada. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 5 que presenta los resultados obtenidos para las mezclas de tejido seco (basidiocarpo) del patógeno más tejido seco de palma, y donde es posible evidenciar que las curvas calculadas y las estimaciones hechas permiten establecer la cantidad de patógeno presente en una muestra de tejido evaluada.

Los resultados preliminares obtenidos con la prueba de qPCR usando la combinación *Gano* mostraron especificidad, sensibilidad, robustez y reproducibilidad, lo que hace que tenga gran potencial para ser empleada como una herramienta en la detección y cuantificación de *Ganoderma* sp. en palmas afectadas con PBE. La validación de estos resultados preliminares con muestras de palmas afectadas colectadas en campo es un paso clave en el desarrollo de una prueba de diagnóstico. Actualmente, muestras de campo colectadas en plan-

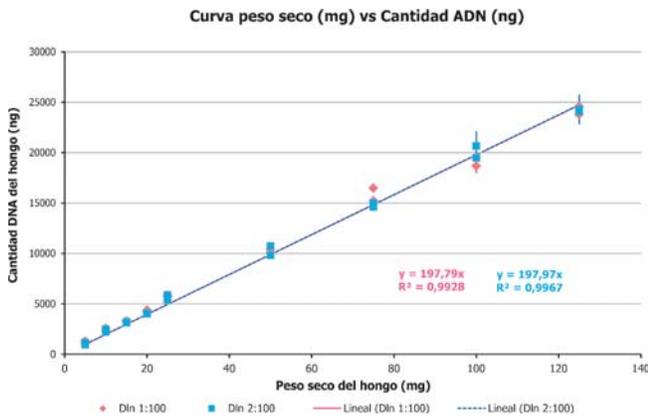


Figura 4. Relación entre el peso seco del patógeno y la cantidad de ADN que es detectada en un ensayo de qPCR usando la combinación Gano.

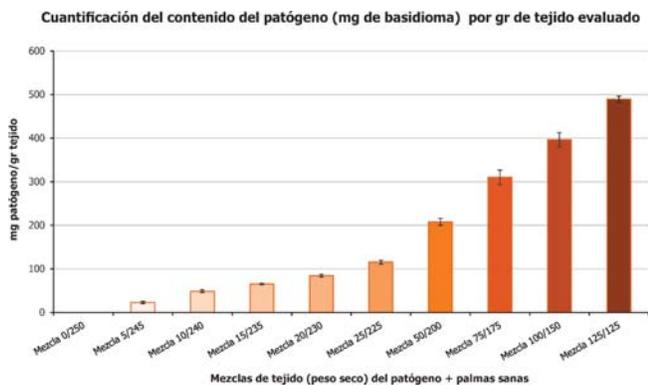


Figura 5. Estimación de la cantidad del patógeno (mg de basidiomata) presente en una muestra de tejido.

taciones con presencia de la enfermedad están siendo analizadas bajo los mismos parámetros presentados en este reporte.

Cenipalma se encuentra evaluando alternativas para la detección temprana de PBE en las zonas afectadas por la enfermedad. Paralelo al trabajo aquí presentado, otras metodologías como la determinación de tejido afectado usando tomógrafos o la cuantificación de ergosterol en palmas afectadas han mostrado resultados promisorios. La evaluación de los aspectos técnicos y económicos de diferentes metodologías de detección permitirá ofrecer al gremio una herramienta confiable y que pueda ser implementada de forma rutinaria para la detección oportuna de la enfermedad.

Agradecimientos

Al personal y directivas de las plantaciones de Indupalma Ltda. y Palmeras de la Costa S.A., y a Fedepalma-Fondo de Fomento Palmero por la financiación de esta investigación.

Bibliografía

Ariffin D, Idris AS, Singh G. 2000. Status of Ganoderma in Oil Palm. In: Ganoderma diseases of perennial crops. Flood J, Bridge PD, Holderness M (eds). CABI Publishing, Wallingford, UK. P.49-68.

Badu BK, Mesapogu S, Sharma A, Somasani SR, Arora DK. 2011. Quantitative real-time PCR assay for rapid detection of plant and human pathogenic *Macrophomina phaseolina* from field and environmental samples. *Mycologia* 103(3):466-473.

Bridge PD, O'Grady EB, Pilotti CA, Sanderson FR. 2000. Development of molecular diagnostics for the detection of Ganoderma isolates pathogenic to oil palm. In: Ganoderma diseases of perennial crops. Flood J, Bridge PD, Holderness M (eds). CABI Publishing, Wallingford, UK. P.225-247.

Chong KP, Lum MS, Foong CP, Wong CMVL, Atong M, Rossall S. 2011. First identification of *Ganoderma boninense* isolated from Sabah based on PCR and sequence homology. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(66): 14718-14723.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Kang S, Mansfield MA, Park B, Geiser DM, Ivors KL, Coffey MD, Grünwald NJ, Martin FN, Lévesque CA, Blair JE. 2010. The promise and pitfalls of sequence-based identification of plant-pathogenic fungi and oomycetes. *Phytopathology* 100:732-737.

Miller RNG. 1995. The characterization of Ganoderma population in oil palm cropping systems. PhD Thesis. University of Teading, UK.

Mohd As'wad AW, Sariah M, Paterson RRM, Zainal Abidin MA, Lima N. 2011. Ergosterol analyses of oil palm seedlings and plants infected with Ganoderma. *Crop Protection* 30: 1438-1442.

Montes-Borrego M. 2011. Real-Time PCR quantification of *Peronospora arborescens*, the opium poppy downy mildew pathogen, in seed stocks and symptomless infected plants. *Plant Disease*. 95:143-152.

Nieto LE. 1994. Pudrición basal del tallo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) causada por *Ganoderma* sp. *Palmas* 15:31-38.

Nieto LE. 1995. Incidencia de pudriciones de estípide de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Colombia. *Palmas* 16:227-232.

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the International Sequence Databases and its implication for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics Online* 4:193-201.

Paterson RRM. 2007. Ganoderma disease of oil palm- a white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Protection*. 26: 1369-1376.

Turner PD. 1981. Oil Palms diseases and disorders. Oxford University Press, Oxford, pp.88-110.

Utomo C, Niepold F. 2000. Development of Diagnostic Methods for Detecting Ganoderma infected Oil Palms. *Journal of Phytopathology*. 148: 507-514.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp.315-322. En: Innis, M., Gelfand, D., Snisky, J. and White. (eds). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, Academic Press.



Director: José Ignacio Sanz Scovino, Ph.D.
 Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma
 Coordinación editorial: Yolanda Moreno Muñoz
 Diseño y diagramación: ACE – Alianza en Comunicación Empresarial Ltda.
 Impresión: Javegraf

Esta publicación contó con el apoyo de Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero