

# Identificación de marcadores moleculares RAPD asociados con la resistencia al complejo Pudrición de Cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.)

*Identification of RAPD molecular markers associated  
with resistance to the Bud Rot complex in oil palm  
(Elaeis guineensis Jacq.)*

IVAN E. OCHOA C.<sup>1</sup>; VICTORIA E. VILLEGAS<sup>1</sup>; STEPHEN E. BEEBE<sup>2</sup>

---

## RESUMEN

El complejo Pudrición de Cogollo (PC) es una enfermedad que ha causado la destrucción de grandes plantaciones de palma de aceite en Centro y Suramérica desde que fue reportada por primera vez en la década del 60, y en la actualidad, la región de los Llanos Orientales presenta una incidencia superior al 60% en áreas importantes. Hasta la fecha, todos los materiales comerciales de palma de aceite han resultado susceptibles en mayor o menor grado a la PC, mientras que la palma americana de aceite o nolí y el híbrido interespecífico entre las dos especies han mostrado tolerancia a la enfermedad. A pesar de que no hay una total claridad respecto al agente causal, se determinó establecer una relación entre un marcador molecular del tipo RAPD y la resistencia a PC, con el fin de identificar individuos portadores de esta característica. De 303 "primers" o cebadores que se evaluaron utilizando mezclas de ADN y con un proceso de tamizado con materiales susceptibles y resistentes, se identificaron cinco cebadores altamente polimórficos, de los cuales solo el A8 conservó su característica discriminante entre materiales susceptibles y resistentes a PC, aunque la distancia entre el marcador y el gen permitió un cierto grado de recombinación inferior al 10% en toda la población evaluada, por lo cual se continúan buscando cebadores que estén más estrechamente ligados a la región que codifica para la resistencia a PC.

## SUMMARY

The bud rot complex (BR) is a disease that has caused the destruction of large plantations of oil palm in Central and South America since it was reported in the 60's. Presently, in the eastern plains of Colombia, BR occurs at an incidence as high as 60% in extensive areas. To date all commercial oil palm materials have been more or less susceptible to BR while the American oil palm and the interspecific hybrid between the two species have presented tolerance to the disease. In spite of the fact that there still is not total clarity as to the causal agent, a relationship was established between a RAPD molecular marker and resistance to BR, with the purpose of identifying individuals with this characteristic. Of 303 primers evaluated using mixtures of DNA, and through a screening of susceptible and resistant materials, five highly polymorphic primers were identified, of which only operon A8 conserved its discriminating character among susceptible and resistant materials. The distance between the marker and the gene appears to permit recombination in the range of 10% in the total population evaluated, reason for which the search continues for markers that are more closely linked to the region coding for resistance to BR.

- 
1. Respectivamente, Biólogo M.Sc. Investigador Principal y Bióloga. Asistente de Investigación. Programa de Fitomejoramiento Cenipalma. Apartado Aéreo 252171 Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.
  2. Fitomejorador, Ph.D. Especialista en germoplasma. Jefe de la Unidad de Recursos Genéticos y del Laboratorio de Caracterización de Germoplasma de Frijol. CIAT. Apartado Aéreo 6713, Cali, Colombia.

Palabras claves: Palma de aceite, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleífera*, Noli, Marcadores moleculares, RAPD, Resistencia a la enfermedad, Híbridos, Herencia, Métodos.

## INTRODUCCION

La enfermedad conocida como Complejo Pudrición de Cogollo (PC) en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) ha causado la destrucción de grandes plantaciones de palma de aceite en Centro y Suramérica. Entre 1964 y 1970 destruyó el 60% de las palmas en la plantación La Arenosa en Turbo, Colombia (Nieto y Gómez 1991).

En 1985, la PC se registró en la región de Tumaco, ocasionando pérdidas del 0,8% de palmas en una plantación de 25 ha., sembradas con material Tenera (Jiménez y Peña 1988). Para 1988, la enfermedad reapareció en Colombia con alta incidencia en algunas plantaciones de los Llanos Orientales y con casos aislados en las Zonas Norte y Occidental (Gómez 1995).

Hasta la fecha, todos los materiales comerciales de palma de aceite se han mostrado, en mayor o menor grado, susceptibles a la pudrición de cogollo (PC), mientras que la palma americana de aceite o noli (*Elaeis oleífera* (H.B.K.) Cortez) y el híbrido interespecífico de las dos especies han mostrado tolerancia a la enfermedad. La solución definitiva y más económica para el control de la PC, a mediano y largo plazo, es la incorporación de la resistencia de la palma americana en materiales híbridos comerciales, tratando de afectar lo menos posible el rendimiento de los materiales comerciales de palma de aceite y conservando la calidad del aceite del noli.

Aunque todavía no se ha podido establecer con toda claridad si el disturbio es causado por un factor biótico o abiótico, los más recientes estudios realizados en Cenipalma sugieren la posibilidad de que un grupo de hongos, entre los cuales se encuentran *Thielaviopsis* sp. y *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr., actúen como agentes causales, pero estos a su vez necesitan ciertas condiciones de predisposición para su establecimiento y expresión como patógenos en el tejido de la palma (Nieto et al. 1996).

Si bien es cierto que la mayoría de los métodos de fitomejoramiento para incorporar resistencia genética

a un patógeno requieren del conocimiento del agente causal, las nuevas técnicas en biotecnología permiten establecer una relación entre un marcador molecular y una característica de interés, que en este caso sería la tolerancia a la enfermedad, lo cual permitiría identificar, de una manera rápida y segura, plántulas tolerantes en la etapa de vivero, con un ahorro considerable en tiempo y recursos económicos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha facilitado los estudios genéticos en plantas y animales. Una variación de la PCR es la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) que genera un marcador de ADN con un solo oligonucleótido utilizado como cebador (Welsh y McClelland 1990; Williams et al. 1990). El polimorfismo generado puede ser el resultado de mutaciones puntuales, inserciones, deleciones o inversiones. Los RAPD son generalmente marcadores dominantes y presentan un tipo de herencia mendeliana simple (Griffing y Griffing 1994).

La simplicidad de esta técnica ha permitido su uso en el análisis de marcadores moleculares asociados con genes de resistencia en diferentes cultivos, como: arroz (Yamazaki et al. 1994), frijol (Haley et al. 1994) y tomate (Klein-Lankhorst et al. 1991), entre otros. En palma de aceite se han utilizado los marcadores RAPD para determinar variabilidad genética dentro de la especie (Shah et al. 1994).

Una forma de optimizar el programa de mejoramiento para resistencia a PC consiste en utilizar las nuevas técnicas en biotecnología y específicamente la de los polimorfismos en el ADN aleatoriamente amplificados (RAPD) para establecer una relación genética entre éstos y la característica de resistencia, y así poder identificar palmas resistentes en poblaciones segregantes.

El objetivo del presente estudio fue identificar uno o varios marcadores RAPD que estén asociados con materiales resistentes a PC para poder identificar los genotipos portadores de esta característica en poblaciones segregantes en etapa de vivero, ahorrando de esta manera tiempo y recursos económicos.

## MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del CIAT, mediante un convenio interinstitucional con Cenipalma.

Como material vegetal se utilizó el tejido basal de la flecha de 36 materiales de *E. oleífera* de origen brasileño (Coari), colombiano (Sinú) y peruano (Jenaro Herrera), 12 genotipos de *E. guineensis*, 13 materiales híbridos F1 de *E. oleífera* x *E. guineensis* y 46 individuos susceptibles de varios retrocruzamientos que habían presentado la enfermedad, más otros 45 individuos de un retrocruzamiento localizado en un foco de PC entre los que se encontraban palmas sanas y enfermas. Todos estos materiales fueron suministrados por las plantaciones Indupalma en San Alberto (Cesar) y La Cabaña y Unipalma, en Cumaral (Meta).

Para la extracción del ADN, el tejido recolectado de todas las muestras se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener entre 7 y 10 g de un polvo fino, del cual se extrajo el ADN utilizando el protocolo de extracción de fríjol desarrollado por el CIAT (González et al. 1995), al que se le introdujeron modificaciones relacionadas con un lavado adicional de cloroformo-octanol para remover la mayor cantidad de fenoles, proteínas y detergente, y un incremento de 1,2 a 2% de ( $\beta$ -mercaptoetanol y de 1,0 a 1,5% de PVP en el buffer de extracción de Dellaporta et al. (1983).

Para generar los marcadores RAPD se utilizaron 303 decanucleótidos cebadores o "primers" del grupo Operon, cuyos porcentajes de guanina-citocina oscilan entre 60 y 70% con una temperatura de fusión de 32 a 34°C. Estos cebadores corresponden a algunos de los 26 Kits o conjuntos de la A a la Z suministrados por Operon Technologies.

La amplificación de los ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hizo según el protocolo de Williams et al. (1990). Para la reacción de amplificación se utilizaron 50 ng de ADN en un cóctel que contiene una concentración de 10 mM de buffer tris-HCl con pH 8,8, 50 mM de KCl, 2,0 mM de cada deoxinucleótido

(dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0,1 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidad de enzima Taq polimerasa, 0,4  $\mu$ M de cada cebador (oligonucleótido cebador) evaluado y aproximadamente 50  $\mu$ l de aceite mineral para cubrir cada muestra.

Los cambios de temperatura necesarios para esta reacción de amplificación se realizaron en un termociclador programado con los siguientes períodos de tiempo: 5 minutos a 94°C, temperatura inicial de denaturación, seguido por 35 ciclos de amplificación, cada uno compuesto por los siguientes intervalos de temperatura: 94°C por un minuto, 36°C por un minuto (temperatura de alineamiento), 72°C, por dos minutos (temperatura de replicación de molde) y, al final del último ciclo, 5 minutos a 72°C, tiempo en el cual se permite culminar los productos parcialmente replicados, quedando las muestras a 4°C hasta la etapa siguiente del proceso.

Los productos de amplificación se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0.5X (Sambrook et al. 1989) y revelados por tinción con bromuro de etidio. Cada gel se expuso a una fuente de rayos ultravioleta de onda corta (300 nm) y se fotografió con película instantánea.

Para la selección de los cebadores que pudiesen servir como marcadores de la tolerancia a PC se tuvieron en cuenta varias fases de análisis. Primero se evaluaron los 303 cebadores con ADN de un individuo *E. oleífera*, un individuo *E. guineensis* y una mezcla de ADN de retrocruzamientos susceptibles. De este grupo se escogieron los que presentaron polimorfismos (bandas presentes en resistentes y ausentes en susceptibles). Estos cebadores polimórficos se amplifican nuevamente con un individuo *E. oleífera*, una mezcla de híbridos F<sub>1</sub>, un material *E. guineensis* y tres diferentes mezclas de ADN de materiales susceptibles, buscando cebadores que generaran bandas en *E. oleífera* e híbridos F<sub>1</sub> y estuviesen ausentes en los materiales susceptibles a la enfermedad (*E. guineensis* y retrocruzamientos que habían presentado la enfermedad). Finalmente, estos cebadores se amplificaron individualmente en toda la población de materiales susceptibles de los retrocruzamientos.

  
*Los materiales  
fueron  
suministrados  
por las  
plantaciones  
Indupalma en  
San Alberto y  
La Cabaña y  
Unipalma, en  
Cumaral.*  


## RESULTADOS Y DISCUSION

De los 303 cebadores evaluados, en la primera etapa se identificaron 76 que generaron productos de amplificación polimórficos, 26 de los cuales se seleccionaron en una segunda etapa cuando se incrementó el número y tipo de individuos evaluados. Finalmente se lograron identificar cinco cebadores promisorios con un total de ocho bandas, entre leves y marcadas, presentes en materiales tolerantes y ausentes en materiales susceptibles. Estos cinco cebadores fueron: A8, H6, B6, W5 y L12, cuyo número de bandas, tamaño y secuencia nucleotídica se puede apreciar en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores seleccionados con su respectiva secuencia y número de bandas polimórficas.

Cebador	Banda	Tamaño (Kb)	Secuencia 5' a 3'
A8	1	1,8	GTGACGTAGG
	2	1,5	
	3	0,9	
H6	1	2,0	ACGCATCGCA
	2	1,0	
B6	1	1,1	TGCTCTGCC
W5	1	1,0	GGCGGATAAG
L12	1	0,7	GGCGGCTACT

Para la selección final del marcador molecular se amplificó toda la población de retrocruzamientos susceptibles y materiales resistentes, buscando que la banda marcadora estuviese siempre presente en todos los materiales genéticamente resistentes a Pudrición de Cogollo (*E. oleífera* e Híbridos F.) y ausente en todos los individuos de *E. guineensis* y retrocruzamientos que habían presentado la enfermedad en el campo.

De los cinco cebadores promisorios evaluados en repetidas ocasiones, sólo el A8 conservó su poder discriminatorio y repetitividad en diferentes individuos, lo cual asegura su confiabilidad para ser estudiado con una población estadísticamente significativa. Los demás cebadores se descartaron por aparecer repetidas veces la banda marcadora en los retrocruzamientos susceptibles.

Las tres bandas polimórficas generadas por el cebador A8 se pueden apreciar en la Fig.1, siendo la segunda banda, con un peso aproximado de 1,5 Kb, la única que consistentemente conservó su característica discriminante entre materiales susceptibles y resistentes en las evaluaciones posteriores.

En la Tabla 2 se presentan los primeros resultados de la evaluación del cebador A8 con 107 materiales resistentes y susceptibles, de los cuales 36 de *E. oleífera*, de distintos orígenes, y 13 híbridos F, resistentes presentaron consistentemente la banda, y de los materiales susceptibles ninguno de los 12 de *E. guineensis* evaluados presentó la banda, y sólo tres de los 40 individuos en dos poblaciones de retrocruzamientos la presentaron, lo que daría menos del 10% de recombinación para la banda en estas dos poblaciones segregantes evaluadas.

Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos para los materiales susceptibles de las dos poblaciones de retrocruzamientos se observa cómo todos los casos de posibles recombinantes aparecen en la población 572, indicando un grado de asociación variable de la banda marcadora con el gen que determina la respuesta a PC y medido por la proporción de recombinantes susceptibles con la banda marcadora, que para las poblaciones evaluadas estuvo entre 0 y 18,75%.

Si se tiene en cuenta que el tamaño poblacional podría estar influenciando los valores observados, esta

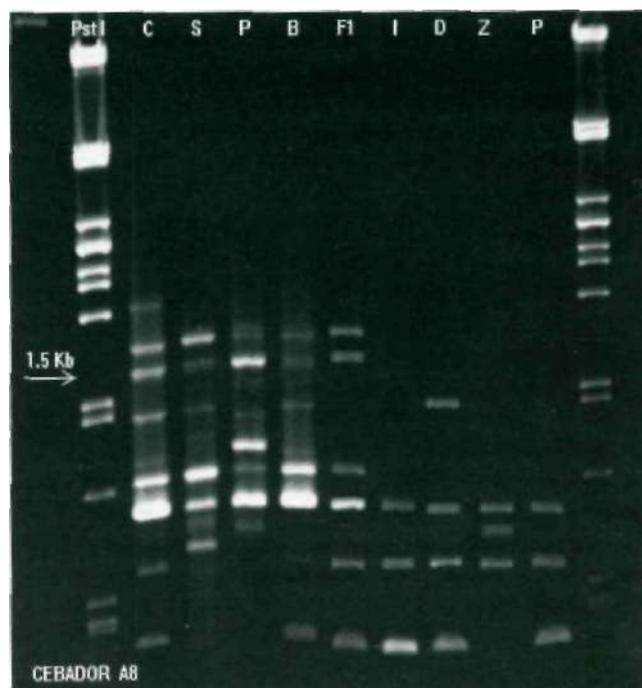


Figura 1. Bandas polimórficas originadas con el cebador A8 en materiales resistentes a PC (C,S,P,B,F I) y ausentes en susceptibles [I,D,Z,P]

PstI: patrón de peso molecular  
 S: *E. oleífera* - Slnú  
 C: *E. oleífera* - Coari  
 P: *E. oleífera* - Perú  
 B: *E. oleífera*- Brasil  
 F.: híbridos F;  
 I,D,Z,P: *E. guineensis*

Tabla 2. Resultados de los primeros 107 individuos analizados con el cebador A8.

Material	Banda	
	presente	ausente
<i>E. oleifera</i>	36	-
Híbridos	13	-
<i>E. guineensis</i>	-	12
Retrocruzamientos susceptibles:		
1. Población 569	0	29
2. Población 572	3	13
Total retrocruzamientos	3	40

respuesta diferencial en el grado de asociación entre el gen y el marcador estaría no sólo relacionada con el fondo genético de cada población en particular, lo cual afectaría la tasa de recombinación o resistencia, sino que podría ser el producto de la segregación de más de un gen o la acción de genes complementarios, por lo cual la banda identificada no sería suficiente para evidenciar un alto grado de resistencia.

Para poder determinar si realmente el cebador A8 era un buen marcador asociado con materiales que no manifestaban PC en el campo, se procedió a amplificarlo con todos y cada uno de los 46 individuos de una de las poblaciones de retrocruzamiento provenientes de un foco de PC y a la que previamente se le habían evaluado sólo los individuos con síntomas de PC en el campo, pero que para esta oportunidad fueron incluidas también las palmas sanas.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de esta evaluación, donde se puede observar que la banda generada por el cebador A8 en dicha población está presentando una segregación en proporción 1:1 para ausencia-presencia (23-23), tal como podría esperarse para una característica monogénica en una población de retrocruzamiento. A su vez, la segregación para PC en la población no presenta esta misma segregación 1:1 teórica para la hipótesis de un gen, lo cual podría deberse a que gran parte de los 10 casos en los cuales no se presenta la banda y no se ha reportado PC, sean

Tabla 3. Total de casos de PC y presencia-ausencia de la banda de 1,5 Kb para el cebador A8 en la población 572 de retrocruzamiento.

Banda	Pc		Total
	-	+	
-	10	13	23
+	20	3	23
Total	30	16	46

escapes o recombinantes que a pesar de no poseer la banda asociada con la resistencia podrían ser individuos resistentes, aunque no se podía descartar un tipo de herencia más compleja, en la cual el exceso de individuos aparentemente resistentes sería el producto de la acción de múltiples genes complementarios.

Por otra parte, para determinar si la banda marcadora en esta población segrega independientemente con respecto a la presencia de PC, se realizó una prueba de independencia con el método de Chi-cuadrado, encontrándose un valor significativo entre el 1 y el 5% de probabilidad para esta prueba (Tabla 4), lo cual indica que la banda no segrega independientemente con respecto a la reacción a PC, es decir, que existe un cierto grado de ligamiento entre el marcador y el gen de resistencia. Sin embargo, el hecho de presentarse tres casos en los cuales aparece la banda en materiales susceptibles, sugiere que el marcador está muy cerca de la región que codifica para la resistencia a PC, pero no lo suficiente como para evitar recombinación genética entre el gen y el marcador.

Tabla 4. Valores observados y esperados y prueba de Chi-cuadrado para determinar el grado de relación entre la banda marcadora de 1,5 Kb del cebador A8 y la presencia de PC en la población 572 de retrocruzamiento.

Banda	PC (+)	
	Observado	Esperado
-	13	8
+	3	8
$\chi^2$ Probabilidad	5,31 0,01-0,05	

Como resultados complementarios se identificaron 38 cebadores que generaron productos de amplificación polimórficos que pueden ser utilizados posteriormente en estudios de variabilidad genética entre y dentro de las dos especies y así poder conformar un germoplasma no redundante con una base genética amplia, la cual permita un mejor y más eficiente uso del recurso genético para alcanzar logros importantes en el mejoramiento de la especie.

## CONCLUSIONES

- De 308 cebadores evaluados sólo el A8 y específicamente la banda de 1,5 Kb demostró tener

un aceptable nivel de discriminación y repetitividad entre materiales susceptibles y resistentes.

En las dos poblaciones de retrocruzamiento estudiadas se presenta un grado de asociación variable entre el marcador y el gen de resistencia medido por la proporción de recombinantes susceptibles que poseen la banda marcadora, cuyo porcentaje para estas poblaciones estuvo entre 0 y 18,75%, con lo cual al eliminar plantas que no tengan la banda se estaría eliminando una alta proporción de individuos susceptibles.

- La banda marcadora del cebador A8 presentó una segregación 1:1 para ausencia-presencia en la población 572 de retrocruzamiento tal como podría esperarse para una característica monogénica en este tipo de materiales, mientras que la segregación para PC presentó un mayor número de individuos susceptibles de los que se esperarían al azar para una segregación 1:1 bajo la hipótesis de un gen, lo cual podría indicar un tipo de herencia más compleja, pero el exceso de individuos resistentes sugiere la acción de múltiples genes complementarios.
- A pesar de que la banda identificada en el cebador A8 tiene buenas posibilidades de funcionar como marcador molecular asociado a PC, se debe continuar con la evaluación de nuevos cebadores que estén más estrechamente ligados a la región que codifica para la resistencia a PC.
- En el proceso de identificación del marcador asociado con la resistencia a PC se lograron detectar 38 cebadores que generaron polimorfismos, los cuales podrían ser utilizados en estudios de variabilidad genética dentro y entre las dos especies de palma de aceite.

## BIBLIOGRAFIA

- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J. J.; HICKS, J. B. 1983. Aplant DNA rniipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter v.1 no.4, p. 19-21.
- GÓMEZ, P.L. 1995. Estado actual de la investigación sobre Pudrición de Cogollo. Palmas (Colombia) v.16 no. 1, p. 9-23.
- GRIFFIN, H. G; GRIFFIN, A.M. 1994. PCR Technology. Current innovation United States of America.
- HALEY, S. D; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J. R; BYRUM, J.; KELLY J.D. 1994. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. Theoretical and Applied Genetics (Estados Unidos) v.86 no.4, p.505-512.
- KLEIN-LANDHORST, R.M.; VERMUNT, R.; WEIDE, R.; LIHARSTAT, T.; ZABEL, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. sculentum*) using random amplified polymorphic DNA RAPD. Theoretical and Applied Genetics (Estados Unidos) v.83 p. 108-114.
- JIMÉNEZ, O. D.; PEÑA, E. 1988. Amarillamiento sorpresivo de las hojas jóvenes. En: B. Ramakrishna (Ed.). Seminario de Problemas Patológicos de la Palma Africana, 6o. Prociandino. Quito, p 78-82.
- NIETO, L.E.; GOMEZ, P.L 1991. Estado actual de la investigación sobre el complejo de Pudrición de Cogollo de la palma aceitera en Colombia. Palmas (Colombia) v.12 no 2, p. 57-58.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. LOZANO, C. 1996. Identificación y reproducción del complejo pudrición de cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Palmas (Colombia) v.17 no 2 p. 63-68..
- GONZÁLEZ, D.O.; PALACIOS, N.; GALLEGOS, G. y TOHME, J. (Comp. y Eds.). 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Unidad de Investigación en Biotecnología, CIAT, Cali. Colombia. 82p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIST. 1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. FA.
- SHAH, F.H.; RASHID, O.; SIMONS, A. J.; DUNSDON, A. 1994. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). Theoretical and Applied Genetics (Estados Unidos) v.89, p. 713-718.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. NucleicAcids Research (Reino Unido) v.18 no. 24, p. 7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J A; TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research (Reino Unido) v.12. p. 6531-6535.
- YAMAZA KI, M.; MIYAO, A.; MONNA, L; ZHONG, H.S.; TSUJI, T.; TOUYANA.T.; SASAKI. T. 1994. Searching RAPD markers for the brown planthopper resistance gene. Bph-1. Rice-genome v.3, p.1,3.