

Polinización por insectos en palma de aceite. Una evaluación de la viabilidad y sostenibilidad a largo plazo de *Elaeidobius kamerunicus*

Insect Pollination of Oil Palm. An Evaluation of the Long-term Viability and Sustainability of *Elaeidobius kamerunicus*

R.W. Caudwell¹;
D. Hunt;
A. Reid²;
B.A. Mensah³

Resumen

El gorgojo polinizador de la palma de aceite *Elaeidobius kamerunicus* Faust, se introdujo desde África Occidental a las áreas palmeras del Sureste Asiático y el Pacífico a principios de la década de 1980. La introducción del gorgojo en Papúa Nueva Guinea contribuyó grandemente a la viabilidad económica de la industria y fue especialmente útil para los pequeños productores. Este documento describe el trabajo llevado a cabo para evaluar la viabilidad y sostenibilidad a largo plazo de la polinización por insectos en palma de aceite con el gorgojo *E. kamerunicus*. El estudio tiene tres objetivos principales: (i) Buscar en las poblaciones existentes de *E. kamerunicus* en Papúa Nueva Guinea y otros países evidencia de infección por nemátodos parásitos, (ii) Determinar el grado de separación genética entre las poblaciones de gorgojos en Papua Nueva Guinea y las poblaciones naturales en África Occidental, usando la técnica del polimorfismo de fragmento amplificado (ÁFLP) para determinación de genotipo, (iii) Evaluar el potencial para mejorar la base genética de la población existente de *E. kamerunicus* en Papúa Nueva Guinea. El trabajo de campo para el estudio se llevó a cabo en todas las regiones palmeras de Papúa Nueva Guinea y también en Indonesia, Gambia y Costa Rica. Se presentan los resultados del estudio con recomendaciones para trabajos futuros.

Summary

The oil palm pollinating' weevil, *Elaeielohius kamerunicus*, was introduced into the oil palm growing areas of South Asia and the Pacific from West Africa in the early 1980s. The introduction of the weevil into Papua New Guinea made a significant contribution to the economic viability of the industry, and was particularly helpful to the smallholder sector. This paper describes work undertaken to evaluate the

Palabras Claves

Palma de aceite. Polinización.
Nemátodos de insectos, *Elaeidobius*,
Insectos Polinizadores, Variación
genética, Marcadores moleculares.
ÁFLP, Técnicas aneliticas.

* Tomado de: The Planter (Malasia) v. 79 no. 923, p. 75-91.2003. Traducido por Fedepalma.

1 . Papua New Guinea Oil Palm Research Association, Dami Research Station, P.O. Box 97, Kimbe. West New Britain Province, Papua New Guinea.

Dirección Actual: 5 Thirlmere Road, Stourport on Sever, Worcestershire, DY 138QL. United Kingdom.

2 . CABI Bioscience, Bakerham Lane, Egham, Surrey, TW20 9TY, United Kingdom.

3 . Department of Zoology, University of Cape Coast, Cape Coast, Ghana.

long-term viability and sustainability of insect pollination of oil palm by *E. kamerunicus*. The study had three main objectives: (i) To screen the existing *E. kamerunicus* populations within Papua New Guinea and overseas for evidence of infection by parasitic nematodes; (ii) To determine the degree of genetic separation between weevil populations in Papua New Guinea and natural populations in West Africa, using the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique for genetic fingerprinting; and (iii) To assess the potential to improve the genetic base of the existing population *E. kamerunicus* within Papua New Guinea. Field work for the study was undertaken in all oil palm growing regions of Papua New Guinea, as well as Indonesia, Ghana, and Costa Rica. The results of the study are presented, and recommendations made for future work.

El *Elaeidobius. kamerunicus* Faust (Coleoptera: Curculionidae) se introdujo en Papúa Nueva en 1982, dando como resultado mejoras significativas en la polinización de la palma de aceite, como ocurrió en Malasia según Basri (1984). Las introducciones mejoraron los niveles de formación de frutos y extracción de aceite, y por lo tanto, los rendimientos.

El gorgojo polinizador contribuyó significativamente a la viabilidad económica de la industria palmera en Papúa Nueva Guinea y fue especialmente muy útil para los pequeños productores, pues los rendimientos se incrementaron notablemente sin causar costos directos al productor y así continuó en el mediano y largo plazo.

Sin embargo, recientemente han surgido inquietudes en relación con la ocurrencia periódica de baja polinización y pérdida de rendimiento en algunas áreas de Malasia (Kang 1999). Kang (1999) reportó que las bajas poblaciones del gorgojo es un factor asociado con este problema y sugirió que esto puede ser causado por efectos directos o indirectos del clima o por el parasitismo de nematodos acrecentado por los cambios de clima. Kang (1999) sugirió que un segundo polinizador, como el *E. subvittatus* (Faust), podría superar este problema complementando al *E. kamerunicus*.

Rao y Law (1988) reportaron el problema de una pobre formación de frutos en algunas áreas de Malasia

Oriental debido a baja polinización. Se encontró que la pobre formación de frutos estacional se debe a la baja polinización causada a su vez por falta de gorgojos polinizadores (Rao y Law 1998). La población de gorgojos decreció dramáticamente cuando en sus nichos de reproducción, las inflorescencias masculinas, se hicieron menos abundantes, coincidiendo con la presencia de una extensa infección de nematodos parásitos y un clima desfavorable. Rao y Law (1998) sugirieron que la población actual de gorgojos, derivada de unas pocas parejas, puede estar sufriendo depresión endogámica y por lo tanto es más susceptible a los nematodos parásitos. Además, se sugiere que estos gorgojos carecen de las características necesarias para adaptarse a condiciones húmedas. Rao y Law (1998) consideran que un complejo de insectos polinizadores cuyo nicho no sea necesariamente la inflorescencia de la palma de aceite puede eventualmente ser necesario.

Rao y Law (1998) resaltaron que las sugerencias de importar lotes frescos de *E. kamerunicus* u otras especies de insectos polinizadores de Camerún requiere alguna investigación prioritaria en aspectos clave. Por ejemplo, en las poblaciones de gorgojo nativo de Camerún también se observó una disminución en la estación lluviosa, pero menos pronunciada. Por lo tanto, sería útil determinar la causa de la disminución en Camerún. Una alta proporción de las pupas y gorgojos

El gorgojo polinizador contribuyó significativamente a la viabilidad económica de la industria palmera en Papúa Nueva Guinea y fue especialmente muy útil para los pequeños productores.

muerdos de la importación original a Malasia estaban infectados con nematodos y por lo tanto fueron destruidos. Así que se sugirió que los nematodos que están actualmente causando problemas probablemente fueron traídos con las poblaciones originales.

Rao y Law (1998) consideran que la sugerencia de depresión endogámica u homocigocidad extrema, plantea el interrogante de por qué los efectos no se manifestaron más temprano después de la introducción, dado el corto tiempo de generación del gorgojo. Además, poblaciones en otros sitios, algunas bajo clima húmedo estacional, también crecieron a partir de un número limitado de parejas. Sugieren que sería interesante investigar que tan serio es el problema potencial de los nematodos parásitos en estas áreas. Rao y Law (1998) concluyen que para contener el parasitismo por nematodos se requiere entender la forma de parasitismo y los factores predisponentes que favorecen el aumento del parasitismo por nematodos en la población de gorgojos. También resaltan que la introducción de nuevos gorgojos requiere la predeterminación de los niveles de resistencia, o por lo menos la heterocigocidad en subgrupos, si existe, y en diferentes especies de gorgojo en el género.

Aunque se han logrado excelentes niveles de formación de frutos en la mayoría de las áreas del proyecto en Papúa Nueva Guinea, se considera que es necesario tomar medidas urgentes para encarar la sostenibilidad de los niveles actuales de polinización por insectos y hacer mejoras para el futuro. La población actual de gorgojos polinizadores en Papúa Nueva Guinea se deriva de un número relativamente pequeño de individuos introducidos de África en 1982. Aparentemente, como ocurre en el Sureste Asiático, se

presentan los mismos problemas de que la posible infección de nematodos, junto con la escasa base genética de la población de gorgojos representa un riesgo significativo para la producción viable y sostenible.

Un proyecto de investigación de dos años, financiado por la Unión Europea, se llevó a cabo en los años 2000 - 2002. Los objetivos del proyecto fueron:

- (i) Buscar en las poblaciones existentes de *Elaeidobius kamerunicus* en Papúa Nueva Guinea y otros países, evidencia de infección por nematodos parásitos
- (ii) Determinar el grado de separación genética entre poblaciones de gorgojo en Papúa Nueva Guinea y poblaciones naturales en África Occidental usando la técnica de polimorfismo de fragmento amplificado (AFLP).
- (iii) Evaluar el potencial para mejorar la base genética de la población existente de *E. kamerunicus* en Papúa Nueva Guinea, ya sea mediante la introducción de lotes frescos de la misma especie de gorgojo o posiblemente por la introducción de nuevas especies de insectos polinizadores de África Occidental o de Suramérica.

En este documento se describen los resultados del proyecto.

Muestreo en el campo

Durante el proyecto se recolectaron gorgojos de Papúa Nueva Guinea, Ghana, Costa Rica e Indonesia. Los gorgojos se recolectaron de todas las regiones palmeras de Papúa Nueva Guinea, por ejemplo, en la Provincia de New Ireland (plantaciones Lamerika y Kabil), en la Provincia de Milne Bay (plantaciones Baraga y Waigini), en la Provincia de Oro (Plantaciones Sangara y Embi) y en la Provincia de West New Britain

(Plantaciones Dami. Kumbango, Kavugara. Kautu y Hargy). Se recolectaron un total de nueve muestras en áreas palmeras de Ghana: Región Oriental (Kade). Región Occidental (Ajumako). Plantación Twifo, Ankaako. Assin Davieso. y Egyrkrom), y en la Región Occidental (Plantación de Palma de Aceite Benso, Ewusiedjoe y Sekondi School del Sordo. También se

recolectaron gorgojos en la estación de investigación Bah Lias cerca de Medan. Indonesia, y en la plantación ASD en Costa Rica (Coto, Celates, Mirador y Quepos). Las muestras de gorgojos se preservaron en formaldehído o se mantuvieron vivas y enviadas al Reino Unido, donde los especímenes vivos se seleccionaron y congelaron a -80°C para el análisis de ADN.

Tabla 1 Ocurrencia de nematodos parásitos, larvas dauer y ácaros ectoforéticos en hembras de *Elaeidobius kamerunicus* de Papúa Nueva Guinea en 2000.

Sitio	% infectado con nematodos parásitos	No. Promedio del número de hembras maduras de nematodos/insecto parasitado	% con larvas dauer de nematodos	% con ácaros ectoforéticos
Provincia New Ireland				
Lamerika	0	0	0	0
Kabil	0	0	0	0
Provincia Milne Bay				
Waigini	4	3,0	0	0
Baraga	50	1,6	0	0
Provincia Oro				
Sangara	8	2,5	2	0
Embi	20	1,8	0	0
West New Britain				
Dami	0	0	0	0
Kumbango	8	2,0	0	0
Kavugara	6	2,0	0	0
Kautu	10	1,4	0	0
Hargy	0	0	0	0

Tabla 2 Datos combinados de todos los sitios (por país) de la incidencia de nematodos parásitos hembra, larvas dauer y ácaros ectoforéticos.

País de origen	No. total de gorgojos disectados	No. de gorgojos con nematodos parásitos	% infectados con nematodos parásitos	Total de nematodos hembra parásitos	Promedio de hembras parásitas por gorgojo infectado	Promedio de hembras parásitas por gorgojo	No. de gorgojos con larvas dauer	% con larvas dauer	No. de gorgojos con ácaros ectoforéticos	% con ácaros ectoforéticos
PNG*: 2000	500	53	10,6	190	3,58	0,38	1	0,20	0	0,0
PNG: 2001	450	28	6,2	161	5,75	0,36	3	0,67	0	0,0
PNG (combinado)	950	81	8,5	350	4,32	0,37	4	0,42	0	0,0
Sumatra	100	6	6,0	11	1,83	0,11	15	15,0	0	0,0
Ghana	450	1	0,2	1	1,0	0,002	76	16,9	90	20,0
Costa Rica	600	0	0,0	0	0,0	0,0	76	12,7	0	0

*Papúa Nueva Guinea

Análisis y examen de nematodos

Materiales y Métodos

Se hicieron disecciones bajo el microscopio estereoscópico con un aumento de $\alpha 25$ y $\alpha 50$. Se colocaron insectos individuales se colocaron en una gota de fijador en una caja de petri y usando pinzas finas, alfileres entomológicos y una aguja fina de jeringa, se retiraron los élitros y se examinó en busca de nematodos, larvas dauer y ácaros ectofoforéticos. Luego se hizo una cuidadosa disección del abdomen para analizar la presencia de nematodos parásitos internos (hembras maduras, juveniles y/o huevos). Los instrumentos se desinfectaron antes de cada disección para evitar contaminación cruzada. La intención original fue analizar 50 insectos de cada sexo, pero esto no fue siempre posible debido a limitaciones de material de *E. kamerunicus* en algunas muestras de Ghana. Los primeros resultados no mostraron diferencias en infección por nematodos entre machos y hembras de tal manera que en la mayoría de los casos se disectaron sólo hembras.

Resultados

Los principales resultados del análisis de nematodos se presentan en las Tablas 1 y 2 y en la Figura 1. Durante el estudio, se encontraron nematodos por primera vez en poblaciones de gorgojo de Papúa Nueva Guinea. Se encontró que el número de hembras parásitas por gorgojo varió considerablemente, siendo 1 el número más bajo y 15 el más alto. En la mayoría de los gorgojos infectados por hembras maduras de nematodos se encontró también un número considerable de huevos e individuos en diferentes estados de desarrollo. En gorgojos altamente infectados, casi toda la cavidad del hemocoelo aparece ocupada por parásitos en varios estados de desarrollo.

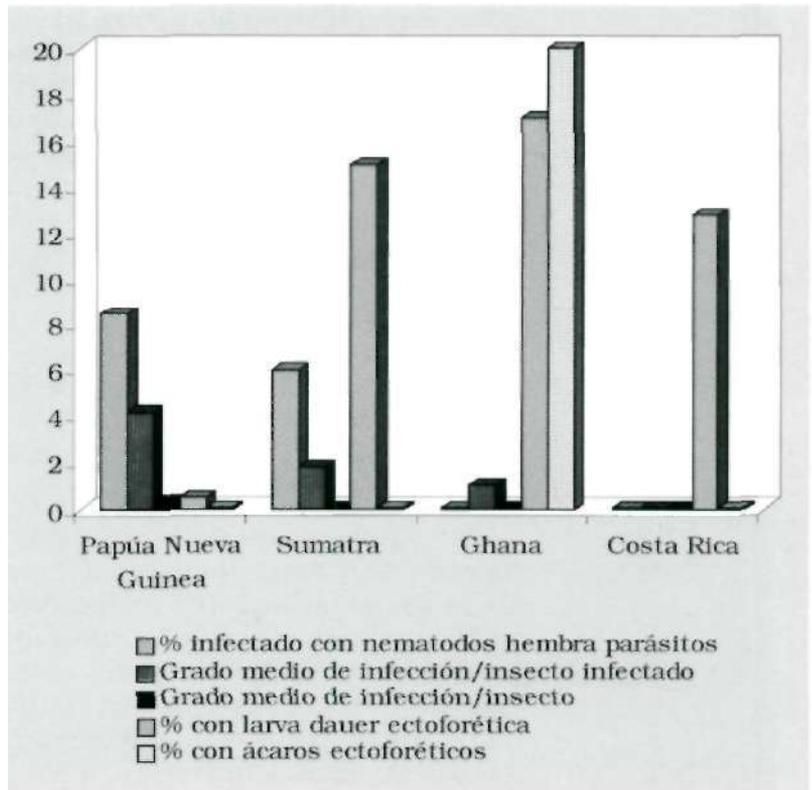


Figura 1

Comparación por país - Grado de infestación del gorgojo polinizador (Nematodos parásitos, larvas dauer, ácaros ectofoforéticos).

Las muestras de Papúa Nueva Guinea revelaron que algunas poblaciones de gorgojos se encontraban aparentemente libres de nematodos, mientras que en otras, el parásito se encontró en el 50% de los gorgojos examinados. Las bajas tasas de infección parecen prevalecer en las muestras provenientes de West New Britain donde se encontraron nematodos parásitos en tres (Kumbango, Kavugara y Kautu) de las cinco áreas examinadas. De los cinco sitios de West New Britain examinados, la tasa de infección varió de 0 a 10%, con un promedio de 4,8% y el promedio de hembras maduras del parásito por gorgojo infectado fluctuó entre 1,4 y 2,0. Las muestras provenientes de Baraga y Milne Bay mostraron una tasa de infección del 50% con un promedio de 1,6 hembras por gorgojo, mientras que Waigini, el otro sitio de

Milne Bay, presentó un porcentaje de infección mucho más bajo (4%). Las muestras provenientes de Sangara, Provincia Oro, mostraron que aunque sólo el 8% de los gorgojos estaban infectados, el promedio de hembras parásitas fue de 2,5 por gorgojo infectado, mientras que Embi, también de la Provincia Oro, presentó un 20% de infección, con un promedio de 1,8 hembras parásitas por gorgojo infectado. En otros sitios, como Lamerika (New Ireland), Dami y Hargy (de West New Britain), no se encontraron nematodos parásitos.

Por otro lado, las muestras provenientes de Ghana, se encontraron libres de parasitismo por nematodos, con excepción de una hembra de gorgojo proveniente de Kade, en la Región Oriental. Esta infección estuvo representada por sólo una hembra de nematodo, algunos juveniles, huevos y varios machos inmaduros. Los gorgojos de Ghana presentaron un gran número de ácaros ectofores, y de hecho, la sección sub-elitral a menudo se encontró llena de estos "pasajeros".

Ahora se sabe ahora que el nematodo parásito del hemocoelo que infecta al *E. kamerunicus* en Papua Nueva Guinea es una nueva especie y nuevo género, *Elaeiolenchus parthenonema* n. sp. (Nematoda: Sphaerularioidea: Anadranematidae) (Poinar et al. 2002), y es probable que se extienda a las zonas palmeras del Sureste Asiático. Este tipo de nematodo parásito obtiene todos sus requerimientos nutricionales del huésped, y por lo tanto se pueden esperar serios problemas de parasitismo que afecten la fecundidad, inclusive produciendo esterilidad debido al agotamiento de la grasa corporal del huésped. Una reducción en las reservas de energía puede también inhibir la habilidad voladora del gorgojo, afectando su habilidad de polinizar las flores de la palma de aceite.

Todavía no es claro si el nematodo parásito *E. parthenonema* fue llevado al Sureste Asiático y Papúa Nueva Guinea con la introducción original de gorgojos provenientes de África Occidental (los niveles de infestación hubieran sido relativamente bajos, pues los gorgojos fueron seleccionados antes de liberarlos), o pudo haber sucedido después a partir de una fuente de infección local. De las nueve poblaciones de gorgojos de Ghana examinadas, sólo se encontró una con nematodos parásitos en el hemocoelo. Este registro se limitó a un solo gorgojo infectado con un nematodo hembra y sus estados juveniles asociados. Aunque este nematodo no estaba bien preservado, aparentemente pertenece a un género diferente de *E. parthenonema*. Ninguno de los seis sitios de Costa Rica, donde también se introdujo el *E. kamerunicus* para mejorar la polinización, resultó infectado con nematodos entornoparásitos. Desde luego, es posible que el parásito esté presente pero en números demasiado bajos para ser detectado por esta investigación.

El ciclo de vida del nematodo parece ser como sigue: La hembra madura del parásito se encuentra en el hemocoelo del gorgojo adulto (también es probable encontrarla en larvas de último instar). La hembra, con forma de salchicha, puede crecer varios milímetros pero es más pequeña en infecciones múltiples. Casi todo su cuerpo está ocupado por el sistema genital, la hembra produce cientos de huevos. La reproducción aparentemente es partenogenética, ya que no se encontraron machos. Los huevos eclosionan dentro del huésped y los juveniles se desarrollan, probablemente, hasta el estado inmaduro vermiforme de la hembra. Las hembras vermiformes (y posiblemente los juveniles en el cuarto estado de desarrollo) son depositadas por la hembra huésped

junto con sus propios huevos. Los nematodos entonces permanecen en el ambiente en estado libre por un tiempo, posiblemente alimentándose de hifas, de hongos antes de penetrar en la larva del gorgojo y migrar al hemocoelo. Aquí ellos absorben alimento de la hemolinfa (posiblemente reduciendo las reservas de grasa del huésped) y crecen enormemente mientras maduran. Todo esto lo hacen a expensas del huésped y uno puede esperar un impacto sobre la grasa corporal, y por lo tanto, sobre la fecundidad.

Desde luego, el hecho de que el nematodo de Papúa Nueva Guinea no se encontrara en las muestras de Ghana, no necesariamente implica que el parásito no se haya originado en África Occidental, pero es sugestivo. Si el nematodo es originario de África Occidental, entonces puede ser, o de muy baja incidencia (sólo un gorgojo que corresponde al 0.2% de los 450 insectos examinados presentó entomoparasitismo) o puede ser de ocurrencia local o restringida). Por ejemplo, por razones logísticas, no se examinaron gorgojos provenientes de Camerún y fue de Camerún de donde se tomaron originalmente las colonias fundadoras del gorgojo.

Genética molecular de *Elaeidobius kamerunicus*

Materiales y Métodos

De la muestra total se seleccionó un número de gorgojos vivos de cada sitio y se congelaron a -80°C para extracción de ADN. Los gorgojos se colocaron individualmente en recipientes de observación en buffer de $100\ \mu\text{l}$ 1 X TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 μM EDTA). Cada insecto se disectó bajo microscopio y se examinó por contaminación de nematodos y/o ácaros. En lo posible, sólo gorgojos no contaminados se usaron para extracción de ADN.

Donde esto no fue posible, el material de gorgojos se dejó con la menor cantidad posible de nematodos y ácaros. El material disectado de cada individuo se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml esterilizado y se almacenó a -20°C hasta que todos los individuos de un solo sitio fueron disectados. La extracción de ADN se llevó a cabo usando el "kit" de extracción de ADN Phytopure (Nucleon Biosciences), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la extracción, las bolitas de ADN se resuspendieron en $50\ \mu\text{l}$ de agua esterilizada y se almacenaron a -20°C .

De cada sitio se examinaron cinco individuos (Tabla 3). Las reacciones AFLP se realizaron usando un protocolo modificado del original de Vos et al. (1995). Se realizó una digestión de enzimas de restricción de $20\ \mu\text{l}$ de ADN genómico, usando cinco unidades de EcoR 1 y 5 unidades de Hpa II en Multi-Core buffer (Promega) en

Origen de las muestras de gorgojo de palma de aceite *Elaeidobius*

Tabla 3 *kamerunicus* examinadas por AFLP y los códigos de identificación usados en árboles.

Pais	Sitio de Muestreo	Código
Papúa Nueva Guinea	Sangara, Provincia Oro	1
Papúa Nueva Guinea	Hargy, West New Britain	2
Papúa Nueva Guinea	Lamerika, New Ireland	3
Papúa Nueva Guinea	Waigini, Milne Bay	4
Papúa Nueva Guinea	Dami, West New Britain	5
Papúa Nueva Guinea	Kavugara, West New Britain	6
Papúa Nueva Guinea	Kumbango, West New Britain	7
Papúa Nueva Guinea	Kautu, West New Britain	8
Costa Rica	Coto	CR
Ghana	Kade, Región Oriental	A
Ghana	Ajumato, Región Central	B
Ghana	Benso Oil Palm Plantation, Región Occidental	C
Ghana	Sekondi School for the Deaf, Región Central	D
Ghana	Twife Oil Palm Plantation, Región Central	E
Ghana	Ankaako, Región Central	F
Ghana	Assin Dadieso, Región Central	G
Ghana	Ewusiedjoe, Región Occidental	H

El gorgojo polinizador contribuyó significativamente a la viabilidad económica de la industria palmera en Papúa Nueva Guinea y fue especialmente muy útil para los pequeños productores.

volúmenes de 40 µl por 1 hora a 37°C. Los adaptadores de doble cadena se ligaron a los fragmentos de ADN genómico digerido en volúmenes totales de 50 µl, usando una unidad de T4 ADN Ligase (Promega) en 10X Multi-Core Buffer y 0,1 µl de ATP (100 mM). Las reacciones se incubaron de un día para otro a 37°C. Los adaptadores fueron los siguientes: ECO-AD1 5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3' y ECO-AD2 5' AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3', HPA-ADI 5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3' y HPA-AD2 5' CGC TCA GGA CTC ATC GT 3'. Todos los "primers" fueron sintetizados por Amersham Pharmacia Biotech. Las cadenas de adaptadores se mezclaron en cantidades equimolares, se calentaron a 95°C por 5 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para formar los adaptadores de doble cadena. El ECO-AD se usó a una concentración de 5 pmols/µl y el HPA-AD a 50 pmols/µl. La mezcla ligada de adaptadores se diluyó 1 en 10 con agua estéril y se almacenó a -20°C.

Las reacciones de preamplificación se realizaron en una HybaidPCR-Express, usando como primers las cadenas adaptadoras ECO-AD1 y HPA-AD1 en volúmenes de 20 µl que contenían 2,0 µl de 10x buffer, 2,0 µl MgCl (25mM), 0,5 ml de cada dNTP (20 mM), 0,5 µl de cada primer (100 pmol/µl), 0,2 µl de polimeraza *Taq* (5 U/µl) (Sigma) y 1µl de la muestra diluida. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 56° por 60 s, 72°C por 90 s y un paso final de 72°C por 5 min. Después de la amplificación, las reacciones se diluyeron 1 en 10 en agua esterilizada y se almacenaron a -20°.

Reacciones selectivas PCR se realizaron usando tres combinaciones de primers, ECO-AT y HPA-CAT, ECO-AT y HPA-CTC, ECO-GC y HPA-CTC. Las secuencias de los primers fueron:

ECO-NN 5' GAC IGC GTA CCA AATTC-NN 3' y HPA-NNN 5' GAT GAG TCC TGA GCG G-NNN 3'. Los primers HCO con marca fluorescente se sintetizaron por MWG Biotech y los primers sin marca HPA por Amersham Pharmacia Biotech. Las amplificaciones selectivas se hicieron en la misma forma de las amplificaciones preselecionadas, excepto que el primer ECO fue usado a una concentración de 2 pmols/µl y se agregó 5 µl de la amplificación preselecionada a cada reacción. Las condiciones del ciclo fueron: 94°C por 2 min. Seguido de 13 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 30 s (cada ciclo reducido en 0,7 C), 72°C por 90 s, seguido de 23 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 90 s y un paso final de 72°C por 10 min. Antes de la electroforesis se agregaron 10 µl de buffer de carga (cambio) a cada reacción, la cual se calentó a 90°C por 3 min. e inmediatamente se colocó en hielo.

Las reacciones se realizaron en 8,0% gel acrilamida Flowgen en un secuenciador automático LiCor 4200. Se cargó un marcador molecular que contiene tamaños de franjas de 350, 325, 300, 255, 230, 204, 200, 175, 145, 120, 105, 100, 95, 75 y 50 pares de base (MWG Biotech) entre cada 10 líneas de muestra para permitir la calibración de cada gel y los análisis subsiguientes.

Para analizar los datos AFLP se usó el programa de computador Gel-Compar II (Applied Maths). Se construyó una tabla binaria a partir de los datos AFLP que muestra la presencia o ausencia por cada 341 franjas diferentes totales producidas por las diferentes combinaciones de primers. Luego, la tabla binaria se analizó en PAUPv4b.10 usando un cálculo con el método "bootstrap" "Neighbor Joining" con la opción BioNJ en efecto de 1000 ciclos y una búsqueda adicional por el método de parsimonia heurística

también con 1000 ciclos para estimación por "bootstrap".

Resultados

El análisis AFLP usando tres diferentes combinaciones selectivas de primers produjo un total de 341 franjas. Éstas se clasificaron como presente / ausente usando GelCompar II para cada una de las 85 muestras analizadas y la tabla binaria resultante tratada con tres diferentes formas de análisis usando PAUP. Las tres técnicas produjeron árboles con similares topologías. El filograma "Neighbor joining" muestra dos clados principales. Uno contiene los aislados de Costa Rica y Papúa Nueva Guinea y el otro contiene las muestras de Ghana. Este filograma se muestra en la Figura 4.

Cada uno de estos clados principales se puede subdividir. Dentro de las muestras de Ghana existen dos clados. El primero contiene todos los aislados de los sitios B, D y G y dos muestras del sitio H y una del sitio E. El segundo contiene todos los aislados de los sitios A, C y F y el resto de las muestras de los sitios E (4) y H (3). Dentro del clado de Papúa Nueva Guinea una rama contiene las muestras de Costa Rica y las de los sitios 4 y 8. El resto de muestras de Papúa Nueva Guinea se reúnen en una rama separada dentro de la cual es posible distinguir otras dos ramas, una contiene muestras de los sitios 1, 2 y 3 y la otra de los sitios 5, 6 y 7. Cuando se realiza el análisis "bootstrap" en estos datos, usando el método "Neighbor Joining", el cladograma (Fig. 3) muestra una topografía similar al árbol NJ (Fig. 2). Las muestras de Ghana y Papúa Nueva Guinea permanecen separadas y todavía hay dos ramas para las muestras de Ghana. Esas dos ramas contienen principalmente las mismas muestras del árbol NJ. El árbol "bootstrap" todavía separa los sitios 4 y 8

de Costa Rica y Papúa Nueva Guinea del resto de los sitios de Papúa Nueva Guinea pero en este árbol el resto de muestras no se separan fácilmente en otras dos ramas. El análisis por parsimonia heurística junto con las estimaciones "bootstrap" produce un cladograma (Fig. 4) con exactamente las mismas agrupaciones del árbol NJ en la Figura 2. En general, los valores bootstrap para los nodos más profundamente arraigados no están bien soportados por ninguno de los árboles en las Figuras 3 y 4, pero como la topografía general para los tres árboles es similar, esto no tiene mucha importancia.

Todos los tres métodos para construcción de árboles dan resultados similares, es decir, las muestras de Papúa Nueva Guinea son genéticamente distintas de las de Ghana. La muestra de Costa Rica se agrupa con los aislados de Papúa Nueva Guinea, lo cual sugiere que esta población es un "subset" de los introducidos originalmente y no un aislamiento fresco de África. Las ramas separadas fuertemente soportadas para las muestras de Papúa Nueva Guinea y Ghana indican que la población anterior está evolucionando separadamente de la de África. Sin embargo, las longitudes de las ramas en el árbol "Neighbor Joining" (Fig. 2) no indican una menor diversidad genética dentro de los aislados de Papúa Nueva Guinea que en los de Ghana. Esto puede ser reflejo de que la población fundadora fue suficientemente grande como para prevenir que ocurra un cuello de botella genético, o más probable, que no ha pasado suficiente tiempo para que se vea el efecto. La caída en eficacia en la población de gorgojos vista en algunas áreas del Sureste Asiático puede ser, en gran parte, debida al parasitismo por nematodos, aunque esta susceptibilidad podría, a su vez, deberse a niveles bajos de diversidad genética

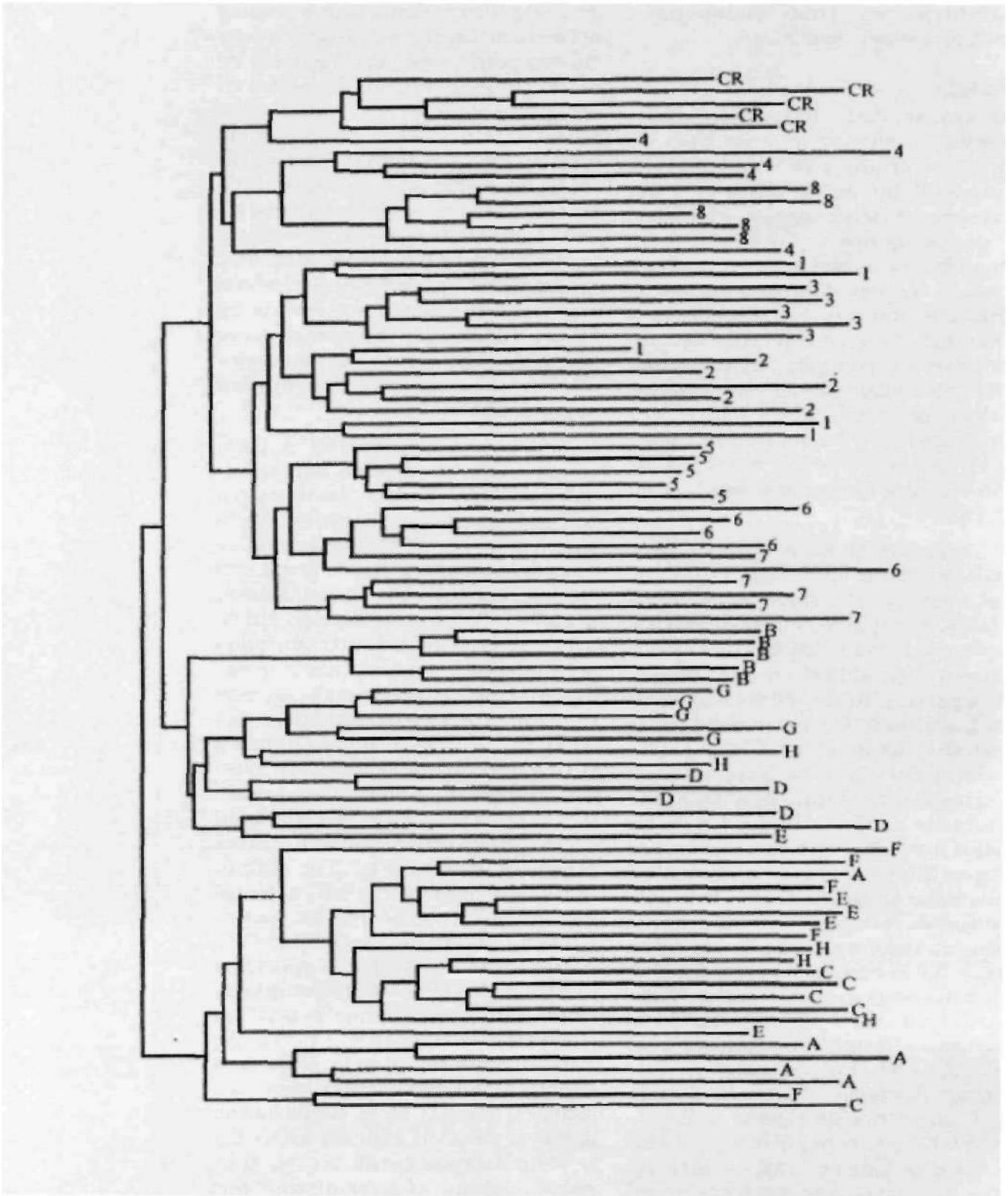


Figura 2 Filograma "Neighbor Joining"

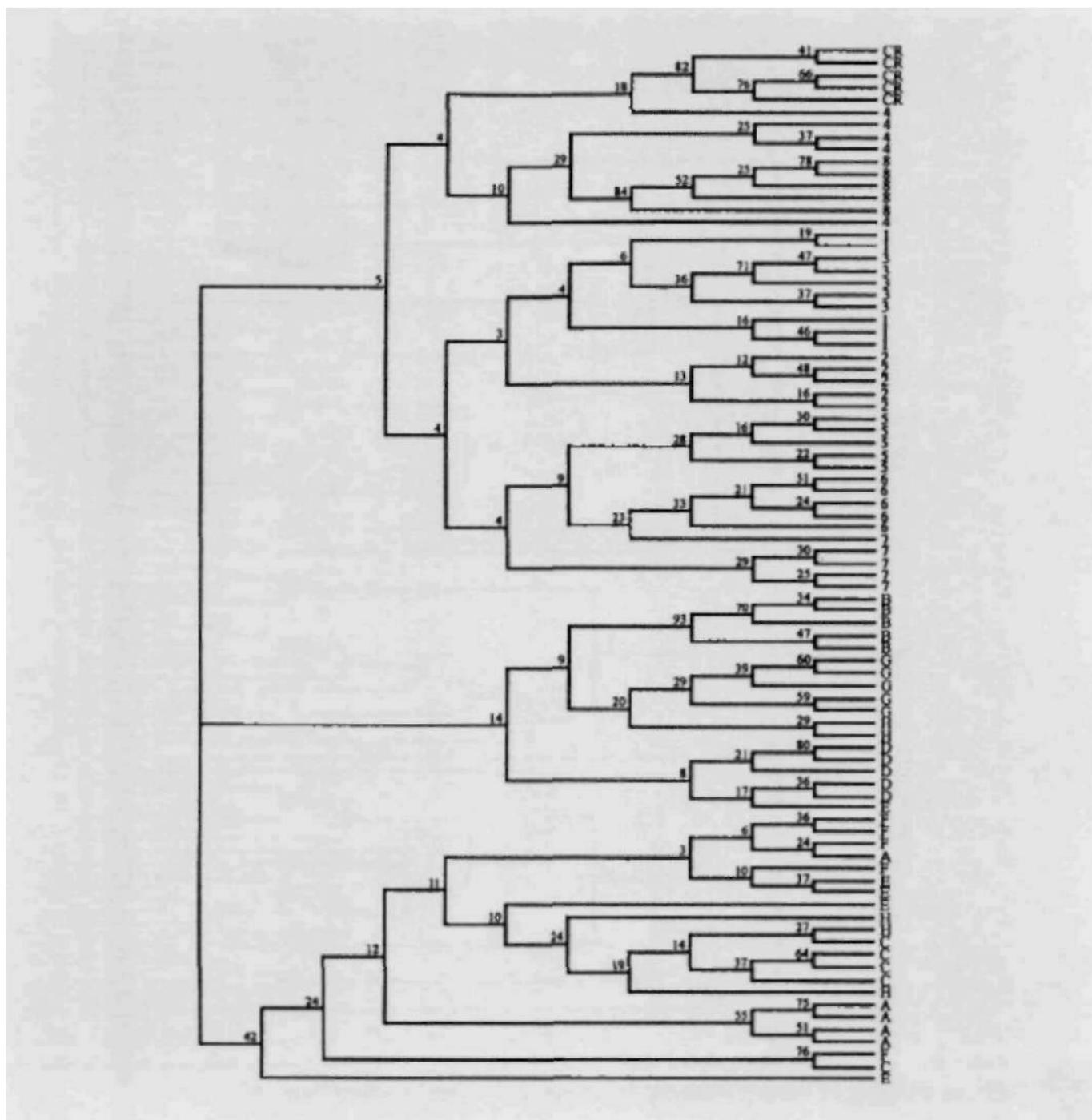


Figura 3 Cladograma "Neighbor joining Bootstrap". Los números en los nodos son valores "bootstrap".

dentro de la población fundadora. Sería ventajoso tener un método rápido para investigar infección por nematodos en poblaciones de gorgojos

Esto se puede lograr clonando un fragmento específico de ADN de una especie. Los primers PCR se pueden diseñar para amplificar este fragmento

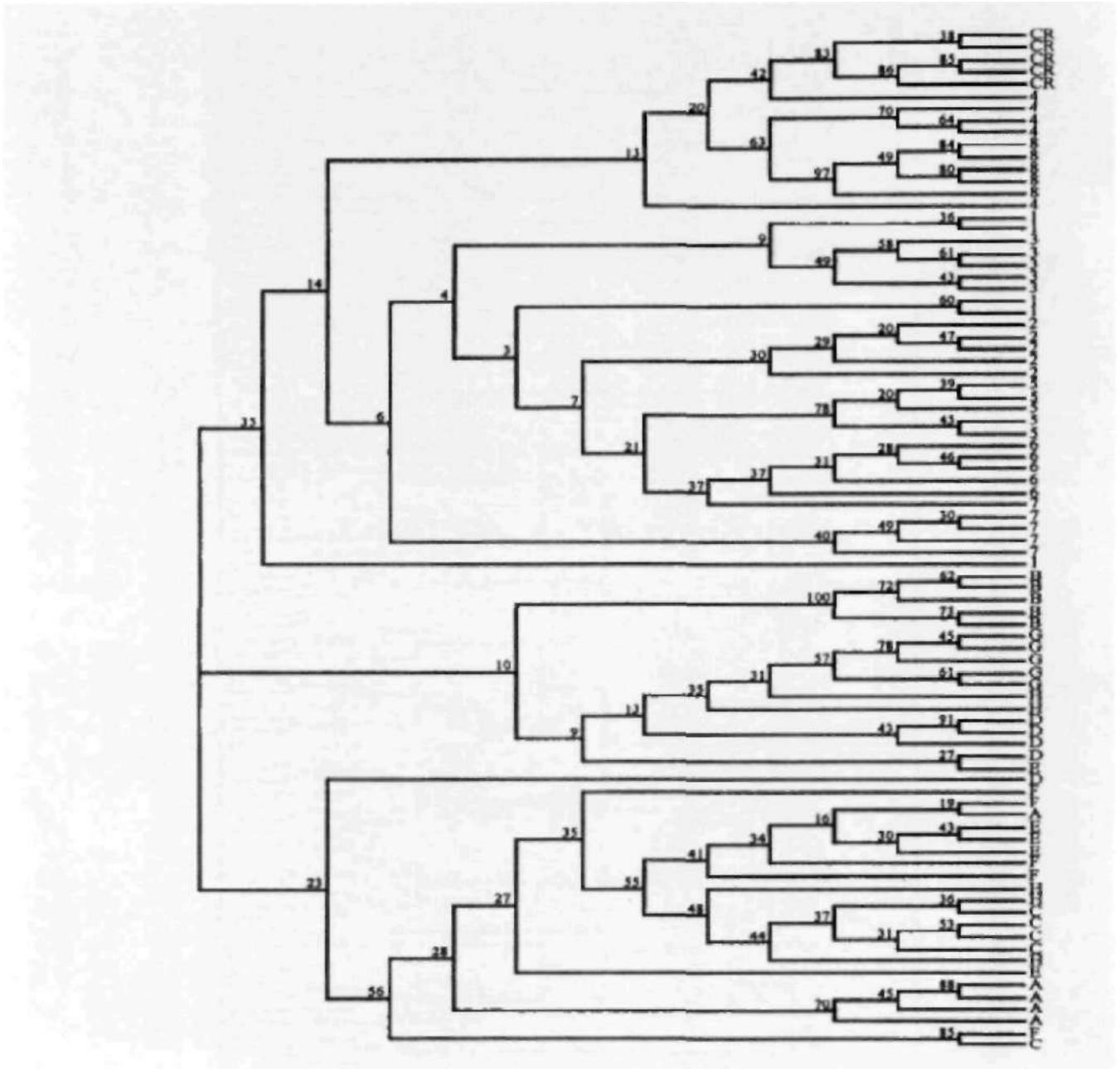


Figura Analisis por parsimonia del Cladograma bootstrap. Los números en los nodos son valores "bootstrap"

específico de ADN, permitiendo la selección rápida de poblaciones de gorgojos para evaluar el grado de parasitismo.

Desafortunadamente no es posible determinar el nivel de flujo de genes usando datos AFLP. Esto se debe a la forma en que los marcadores AFLP son

dominante heredados haciendo imposible clasificar heterocigotos. Para obtener un reflejo verdadero de los niveles de flujo de genes entre sitios en Papua Nueva Guinea sería necesario seleccionar las poblaciones usando un marcador que permita la clasificación de heterocigotos. Los

marcadores microsatélite son ideales para tal estudio. La ventaja de la construcción de una biblioteca de estos marcadores es doble. Primero, sería posible determinar el nivel de integración de cualquier introducción subsiguiente de nuevas poblaciones de gorgojo africano. Los marcadores microsatélite también permitirían medir la diseminación de los nuevos aislados introducidos, a partir de la fuente.

Potencial para nuevo material genético

Durante el proyecto, grandes cantidades de insectos se encontraron en inflorescencias masculinas y femeninas de palma de aceite en Ghana. Estos insectos se encontraron en inflorescencias masculinas durante la anthesis y en flores femeninas durante los primeros días de receptividad. De los insectos presentes en inflorescencias masculinas, los más abundantes fueron *Elaeidobius* spp y *Atheta* spp. Éstos incluyen *E. kamerunicus*, *E. plagiatus*, y *E. subvittatus*. De los insectos presentes en grandes números en inflorescencias masculinas, sólo *E. subvittatus* y *Atheta* sp. se encontraron en inflorescencias femeninas y en pocas cantidades. Sin embargo, como lo reportó Syed (1979), la continua observación de inflorescencias femeninas a lo largo del período de receptividad revela que un gran número de insectos las visitaron durante el día y que estos insectos tienden a llegar en bandadas intermitentes.

Durante el proyecto se encontró que *E. kamerunicus*, *E. plagiatus* y *E. subvittatus* visitan inflorescencias femeninas y usualmente estaban cargados con granos de polen. Sin embargo, durante el trabajo de campo se encontró que la taxonomía del género *Elaeidobius* es algo complicada y que dentro del género hay por lo menos dos especies nunca descritas. Dos nuevas especies de *Elaeidobius* se han

descubierto y están en el proceso de descripción. Además de esto, el género *Elaeidobius* también se ha revisado. El Museo de Historia de Londres está en el proceso de preparar una guía taxonómica que es absolutamente esencial para próximas operaciones de campo.

En Costa Rica, donde se presentan *E. kamerunicus*, *Mystrops costaricensis* Gillogly, *E. subvittatus*, el *E. kamerunicus* sobrepasa a las otras dos especies. *E. kamerunicus* generalmente es el polinizador dominante la mayor parte del año y es particularmente útil, ya que es numeroso y activo tanto en tiempos secos como húmedos. También se encontró que carga más granos de polen que las otras especies y responde mejor al aroma de la inflorescencia femenina. *E. kamerunicus* también tiene la ventaja de tener la palma de aceite como huésped específico, mientras que *M. costaricensis* se alimenta también de otras palmas, incluyendo la palma de coco. Se encontró que la lluvia, en general, tiene un efecto depresivo tanto en *M. costaricensis* como en *E. subvittatus*, de hecho, fue este factor el que generó interés en introducir *E. kamerunicus* de África.

Durante el proyecto ha sido muy difícil identificar insectos que puedan competir con el *E. kamerunicus* para mejorar la polinización de palma de aceite en Papúa Nueva Guinea. Por lo tanto, la introducción de lotes frescos de *E. kamerunicus* en Papúa Nueva Guinea desde África es recomendable. Sin embargo, esto no se puede hacer hasta que la incertidumbre acerca de la taxonomía del género *Elaeidobius* se haya resuelto, en particular en lo referente al estatus de las dos especies no descritas previamente dentro de este género y el impacto que puedan tener en la polinización. Otros problemas incluyen la amplia ocurrencia de parasitismo por nematodos en las poblaciones de gorgojos polinizadores

en Papúa Nueva Guinea y la carencia de información biológica básica en relación con estos parásitos, especialmente con respecto al efecto que puedan tener en el huésped. El origen de los nematodos es todavía incierto, por lo tanto existen interrogantes sobre los requerimientos de cuarentena para cualquier introducción futura.

Discusión general

Se ha progresado considerablemente en los tres objetivos originales del proyecto. Sin embargo, más trabajo es necesario para poder entender completamente una serie de inquietudes científicas que surgieron durante el proyecto. Una de ellas ya se ha resuelto de tal manera que el objetivo general de introducir nuevo material genético puede continuar.

El trabajo futuro debe incluir:

- a. Se requiere mayor estudio de la ecología, biología y distribución del nematodo parásito para cuantificar el impacto real y potencial del parásito en su huésped y su efecto en la polinización y por lo tanto en la producción de aceite de palma. La incertidumbre sobre el origen de los nematodos tiene implicaciones en los requerimientos de cuarentena para nuevas introducciones. Además, la amplia propagación del parásito ha hecho que la extracción de ADN sea ardua y difícil.
- b. Se requiere más investigación en África Occidental para establecer si el parásito está presente en otras áreas, y si es así, en que grado. El examen de especies relacionadas de *Elaeidobius* (incluyendo las especies no descritas descubiertas en Ghana como resultado de este proyecto) es esencial si se va a considerar la introducción de polinizadores no nativos.
- c. Se debe llevar a cabo un análisis molecular de nuevas especies de

Elaeidobius para determinar la variabilidad genética entre las diferentes especies. Esto se puede lograr a través del análisis de datos de secuencias generadas a partir de la región espaciadora intergénica transcrita de las secuencias de ADN ribosomal. La generación de esta información conduciría a un mejor conocimiento de las relaciones entre géneros.

- d. Es necesario desarrollar una técnica rápida, preferiblemente cuantificable y suficientemente robusta, para ser usada en campo para detectar el nematodo parásito en gorgojos "machacados", obviando la necesidad de disectar un gran número de insectos. Este ensayo también sería útil para efectos de cuarentenas.
- e. Es necesario desarrollar un ensayo basado en microsatélites para poder medir el flujo genético real entre las diferentes poblaciones de gorgojo tanto en África como en Papúa Nueva Guinea.
- f. Se debe resolver la incertidumbre alrededor de la taxonomía del género *Elaeidobius*, particularmente el estatus de las dos especies no descritas dentro del género. El papel de estas dos especies en la polinización de palma de aceite también debe ser investigado.

Agradecimientos

La Asociación para la Investigación de Palma de Aceite en Papúa Nueva Guinea agradece sinceramente a la delegación de la Unión Europea en Port Moresby por su apoyo y financiación de este proyecto.

También queremos reconocer y agradecer a la industria palmera en Papúa Nueva Guinea por su continuo apoyo y financiación a la Asociación de Investigación de Palma de Aceite de Papúa Nueva Guinea.

Gracias también a ASD Oil Palms de Costa Rica, especialmente al Dr. Carlos Chinchilla, y al personal en Londres, Sumatra e Indonesia por su ayuda en el trabajo de campo.

Bibliografía

- BASRI, M.W. 1984. Developments of the oil palm pollinator *Elaeidobius kamerunicus* in Malaysia. Palm. Oil Development (Malasia) no. 2, p. 1-3.
- KANG, S.M. 1999. *Elaeidobius kamerunicus* story. The Planter, (Malasia) v. 75 no. 876. p. 143-150.
- POINAR. G.O.Jr.; JACKSON. T.A.; BELL. N.L.; WAHID. M.B. 2002. *Elaeolenchus parthenonema* n.g., n.s.p. (Nematoda: Sphaerularioidea: Anandranematidae n. fam.) parasitic in the palm-pollinating weevil *Elaeidobius kamerunicus* Faust. with a phylogenetic synopsis of the Sphaerularioidea Lubbock, 1861. Systematic Parasitology, v. 52, p. 219-225.
- RAO, V.; LAW. I.H.; 1998. The problem of poor fruitset in part of the East Malaysia. The Planter (Malasia) v. 74 no. 870. P., 463-483.
- SYED, R.A. 1979. Studies on oil palm pollination by insects. Bulletin of Entomological Research (Inglaterra) v. 69. p. 213-224.
- VOS, P.; HOGERS. R.; BLEEKER. M.; REIJANS. M.; LEE, T.H. VAN DER; HORNES. M.; FRIJTERS. A.; POT, J.; PALEMAN. J.; KUIPER, M.; ZABEAU. M.: 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research (Inglaterra) v. 23. p. 4407-4414.

El Mundo de la Palma de Aceite... A un "CLICK"

Novedades

-  **Motor de búsqueda**
-  **Noticias**
-  **Consulta bibliográfica**
-  **Listas de correo**
-  **Preguntas y Respuestas**
-  **Geografía Palmera de Colombia**
-  **Información personalizada para palmicultores**



www.fedepalma.org