DETECCIÓN RÁPIDA EN CAMPO DE FITOPLASMAS DE COCOTERO EN ÁFRICA

■ PROBLEMA ABORDADO

La importancia de frenar la muerte del cocotero por infección de fitoplasmas en África

Los fitoplasmas de cocotero en África están relacionados con las enfermedades del amarillamiento letal y han sido asociados a la muerte de muchos cocoteros en regiones costeras del este y oeste de África. Estas enfermedades son también responsables de la destrucción de la subsistencia de muchos pequeños agricultores y de la caída de la industria del coco en países como Ghana y Mozambique. La epidemia inicial en Ghana perjudicó a la industria del coco en la región de Volta en los 1950s, y la epidemia más reciente en las regiones Central y Occidental ha matado más de un millón de cocoteros (Eziashi y Omamor, 2010). Estos fitoplasmas han sido clasificados como 16SrXXII-A '*Candidatus* Phytoplasma palmícola' en Camerún, Nigeria y Mozambique; cepas de 16SrXXII-B '*Ca.* P. palmicola' en Ghana y Costa de Marfil; y el grupo de declinamiento letal de Tanzania (TLD) en Tanzania y Kenia. Estos fitoplasmas son diferentes de los asociados con la enfermedad del amarillamiento letal del cocotero (ALC) en México y el Caribe, pero todos pertenecen al grupo 16SIV (Harrison *et al.,* 2014).

En Ghana se han probado genotipos de palmas híbridas resistentes contra el fitoplasma 16SrXXII-B, y las únicas opciones de gestión eficiente de la enfermedad disponibles en la actualidad son la rápida y sistemática extracción y quema de las palmas infectadas, con el fin de eliminar las fuentes de infección de fitoplasmas, seguida de la replantación con palmas sanas. Uno de los factores que pueden mejorar considerablemente el éxito de esta estrategia es la detección temprana de palmas infectadas para que puedan ser extraídas antes de que tengan oportunidad de contagiar palmeras adyacentes. Esta ficha detalla el desarrollo y utilización de un sistema de detección temprana sobre el terreno, con una duración de 20 minutos, para la detección de 16SrXXII '*Ca.* P. palmícola' en cocotero en África.

• Cocoteros muertos por causa de infección con 16SrXXII-B '*Candidatus* Phytoplasma palmícola' en Ghana.

Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión Nº 727459

■ RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN MÁS RECIENTES

Métodos de diagnóstico temprano para combatir la propagación de fitoplasmas del cocotero

Los *métodos* de diagnóstico de detección de fitoplasmas de cocotero utilizados en todo el mundo, requieren del transporte de las muestras del tronco desde la plantación en la que son recogidas, hasta el laboratorio en el que se realiza la extracción de ADN, seguida de ensayos mediante PCR con resultados analizados a través de electroforesis con gel. Debido a que las zonas afectadas de muchos países están muy aisladas, especialmente en el África subsahariana, el proceso desde la toma de muestras hasta la obtención de resultados puede llegar a durar dos o más días. Los sistemas de detección sobre el terreno mediante amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP) se han mostrado mucho más rápidos que PCR, con la ventaja de poder trabajar muestras de ADN relativamente impuras. Además, los dispositivos LAMP son portátiles y funcionan mediante batería, lo que permite su utilización en zonas aisladas; y permiten visualizar la detección de productos de reacción LAMP en 15-20 minutos. Se han desarrollado mezclas maestras de reactivos LAMP que permanecen estables en temperatura ambiente durante un período mínimo de un mes, por lo que pueden transportarse fácilmente a estas zonas remotas.

• Toma de muestras de tronco de cocoteros para extracción de ADN sobre el terreno.

Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión Nº 727459

■ ACTVIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TROPICSAFE

Contribución de TROPICSAFE a la mejora de los sistemas de detección LAMP en campo

El objetivo del trabajo de TROPICSAFE es diseñar y validar cebadores específicos para fitoplasmas de cocotero que puedan ser incorporados, juntos con mezclas maestras y sistemas de detección, en el proceso de detección LAMP de enfermedades de cocotero en campo. Además se persigue desarrollar y validar un sistema de extracción de ADN de muestras de tronco que pueda ser realizado con el uso de un equipo mínimo. El objetivo general es el desarrollo y la validación de un sistema capaz de detectar la presencia de fitoplasmas específicos en cocoteros de zonas remotas en un tiempo máximo de 20 minutos, con el uso de un equipo mínimo.

Los cebadores LAMP han sido diseñados en la base de la secuencia del gen *leuS* de '*Ca.* P. palmicola' y son capaces de detectar fitoplasmas 16SrXXII-A y 16SrXXII-B al cabo de 20 minutos mediante un sistema LAMP. Estos cebadores han sido validados en muestras en Ghana, Nigeria y Mozambique; y también se ha demostrado que no tienen reacción con fitoplasmas de TLD de cocotero en Tanzania, ADN de fitoplasmas 16SrIV-A (ALC) en EE.UU. y Méjico, fitoplasmas 16SrIV-D de cocotero en Méjico o fitoplasmas de todos los demás grupos analizados (16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVI, 16SrIX, 16SrX, 16SrXI and 16SrXIV). Además, se ha validado un procedimiento de extracción de ADN basado en el uso del método PEG alcalino de Chomczynski y Rymaszewski (2006), en el que se colocan de 10 a 20 mg de muestras de tronco de coco directamente desde la punta del taladro en 500 µl de tampón de PEG alcalino y se muelen durante 30 segundos con un micromortero de plástico desechable. A continuación, se utiliza un microlitro del sobrenadante directamente en la reacción LAMP. Adicionalmente, se ha diseñado un segundo set de cebadores para confirmar que la calidad del ADN extraído es adecuada para LAMP y detectar el gen citocromo oxidasa del cocotero.

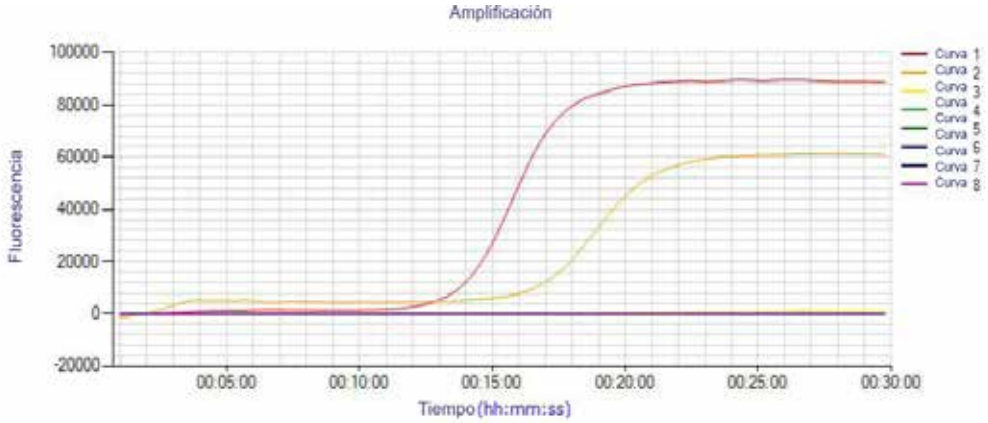
• Configuración de diagnóstico LAMP con equipo portátil para extracción de ADN y detección de fitoplasmas en campo.

Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión Nº 727459

■ DATOS CIENTÍFICOS Y PRIMEROS RESULTADOS

Primeros análisis en campo en Ghana y potencialidad para el Caribe y América

Se ha desarrollado una prueba de diagnóstico LAMP para su uso en campo que permita la detección rápida y específica del fitoplasma 16SrXXII asociado al amarillamiento letal del cocotero en África. Esta prueba se ha combinado con un sistema de extracción rápida de ADN que utiliza un equipo mínimo para analizar muestras de tronco en campo y entregar los resultados en 20-30 minutos tras su extracción. Cada muestra es analizada en la máquina portátil LAMP simultáneamente con dos juegos de cebadores, uno para el ADN del fitoplasma 16SrXXII y otro para el ADN del cocotero. Por lo tanto, cualquier muestra que dé resultado positivo para los primers de fitoplasma se puede considerar positiva para la presencia del mismo, mientras que cualquier muestra que sea negativa para dichos cebadores pero positiva para los cebadores de cocotero, puede considerarse negativa para la presencia de niveles detectables de fitoplasma y, por lo tanto, es probable que no esté infectada. Cualquier muestra que sea negativa en los dos sets de cebadores, se considera que contiene inhibidores de enzimas de reacción LAMP (o que no contienen ADN), por lo que se necesitaría otra nueva prueba de extracción de ADN. Este método ha sido probado en campo en Ghana y las muestras de tronco almacenadas han sido enviadas a la Universidad de Notthingham, Reino Unido. Se ha preparado otro set de cebadores para la detección rápida y específica de los fitoplasmas 16SrIV-A y 16SrIV-D, con potencialidad para detección rápida en campo en cocoteros del Caribe y las Américas, zonas en las que estos fitoplasmas están asociados al amarillamiento letal del cocotero.



• Perfil de detección LAMP para fitoplasma 16SrXXII. Las curvas 1 y 2 muestran reacciones positivas de palmas infectadas con fitoplasma, las curvas 3-7 reacciones negativas y la curva 8 muestra un control de agua.

PALABRAS CLAVE

LAMP, amarillamiento letal del cocotero, detección en campo, fitoplasmas

MÁS INFORMACIÓN

Chomczynski P., Rymaszewski M. 2006. Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. *BioTechniques* 40, 454-458.

Eziashi E., Omamor I. 2010. Lethal yellowing disease of the coconut palms (*Cocos nucifera* L.): an overview of the crises. *African Journal of Biotechnology* 9, 9122–9127.

Harrison N., Davis R.E., Oropeza C., Helmick E., Narvaez M., Eden-Green S., Dollet M., Dickinson M. 2014. '*Candidatus* Phytoplasma palmicola', a novel taxon associated with a lethal yellowing-type disease (LYD) of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1890-1899.

CRÉDITOS

Matt Dickinson Universidad de Nottingham, Escuela de Biociencias, Nottingham (Reino Unido) matthew.dickinson@nottingham.ac.uk

Ndede Yankey Consejo de Programa de Investigación Científica-Instituto de Investigaciones de Palma de Aceite (CSIR-OPRI), Sekondi (Ghana) ndedeyankey@yahoo.com

Febrero de 2019

Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión Nº 727459