

Carlos A. Puch Hau,
 Carlos Oropeza Salín,
 Felipe Sánchez Teyer,
 Adriana Quiroz Moreno,
 Zizumbo Villareal,
 Iván Córdova Lara,
 Verónica Limones Briones
 y Luis A. Sáenz Carbonell*
 CENTRO DE INVESTIGACIÓN
 CIENTÍFICA DE YUCATÁN.

*Autor responsable:
 vyca@cicy.mx

BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA AL AMARILLAMIENTO LETAL EN COCOTERO

SEARCH FOR MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO COCONUT LETHAL YELLOWING DISEASE

R E S U M E N

En este estudio, empleamos la técnica AFLP-RGC para el desarrollo de marcadores moleculares asociados con la resistencia a las enfermedades del cocotero, entre ellas el amarillamiento letal (AL). Con esta técnica logramos identificar 12 bandas polimórficas entre ecotipos de cocotero resistentes y susceptibles al AL. Seis de estos marcadores estuvieron presentes solamente en los ecotipos resistentes y las otras seis en los susceptibles. Los marcadores moleculares que logremos desarrollar pueden ser empleados para la selección de características de interés como la resistencia a plagas y enfermedades.

Palabras clave:
 Amarillamiento letal, genes de
 resistencia

ABSTRACT

In this study the AFLP-RGC technique was used for the development of molecular markers associated with resistance to coconut diseases, including lethal yellowing disease (LY). With this technique, 12 polymorphic bands were identified between coconut ecotypes resistant and susceptible to LY. Six of the markers were present only in the resistant ecotypes and the other six in the susceptible ones. The molecular markers we have identified can be used in the selection of important characteristics such as resistance to pests and diseases.

Key words: lethal yellowing disease, resistance genes, coconut palm ecotypes

INTRODUCCIÓN

EL cocotero (*Cocos nucifera* L.) es un importante cultivo perenne que contribuye significativamente a la seguridad alimentaria, generación de empleos e ingresos. Cultivado en los trópicos en un área estimada de 12 millones de ha (Foale, 2005). Desafortunadamente, esta palma está sujeta al ataque por diversos agentes que producen enfermedades, incluyendo virus (Rohde *et al.*, 1990), viroides (Hanold y Randles, 1991), protozoos (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos (Joseph y Radha, 1975), nematodos (Griffith, 1978) y los mollicutes como *Candidatus Phytoplasma palme* responsable de la enfermedad devastadora conocida como el amarillamiento letal (Oropeza y Zizumbo-Villareal, 1997). Debido a la importancia de este cultivo, el desarrollo de la resistencia a estas enfermedades representa uno de los principales objetivos dentro de los programas del mejoramiento genético. En este estudio, empleamos la técnica de AFLP-RGC (Amplificación de fragmentos largos polimórficos acopladas a secuencias candidatas a genes de resistencia) (Hayes y Saghai, 2000; Egea-Gilabert *et al.*, 2003) para la identificación de marcadores moleculares posiblemente asociados con la resistencia a la enfermedad del amarillamiento letal. Esta técnica se basa en el uso de un iniciador específico de la técnica de AFLP más un iniciador degenerado diseñado a partir del dominio NBS (sitio de unión a nucleótidos) de los genes de resistencia (*R*). Los genes *R*, se encuentran involucrados en conferir resistencia a una amplia variedad de patógenos y plagas, (Dangl y Jones, 2001) permitiendo de esta manera la oportunidad para generar la resistencia a enfermedades a través de su introgresión dentro de variedades susceptibles.

METODOLOGÍA

Dos ecotipos de cocotero resistentes (Enano Malayo Amarillo) y susceptibles (Alto del Atlántico Mexicano) al amarillamiento letal (Zizumbo-Villareal *et al.*, 2008) fueron usados en este estudio. El ADN fue extraído a partir de 100 mg de muestra del tejido de hoja (Harrison *et al.*, 1994). Para el desarrollo de la técnica AFLP-RGC el ADN fue digerido y la ligación de los adaptadores fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo estándar de AFLP (Vos *et al.*, 1995). El ADN fue pre-amplificado usando los iniciadores homólogos a los adaptadores *EcoR1* o *Mse1* con un nucleótido selectivo (*EcoR1* + A, *Mse1*+C). Posteriormente las amplificaciones selectivas fueron desarrolladas a partir de 2 μ l del ADN pre-amplificado con los iniciadores *EcoR1* o *Mse1* con dos o tres nucleótidos selectivos

y un iniciador diseñado a partir del dominio NBS de los genes de resistencia, empleando el protocolo de PCR touchdown descrito por Vos *et al.* (1995). En total se evaluaron 20 combinaciones de iniciadores. Finalmente las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% y fueron teñidos con nitrato de plata (Sambrook *et al.* 1989).

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N

El mejoramiento genético ha sido la base para generar nuevas variedades que respondan a las necesidades particulares de una sociedad. Sin embargo, el aprovechamiento de la variabilidad genética mediante estrategias convencionales de mejoramiento implica una gran inversión de tiempo y recursos. Para acelerar el progreso, la identificación de marcadores moleculares de ADN relacionados con regiones genómicas de características de interés como la resistencia a plagas y enfermedades es sumamente importante.

El cultivo del cocotero, es afectado por una gran diversidad de patógenos entre las que se encuentra el fitoplasma causante de la enfermedad del amarillamiento letal, la cual afecta también a muchas otras especies de palmas. El desarrollo de un programa de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares, representa una importante herramienta para generar resistencia a dichas enfermedades. En este estudio, empleando la técnica de AFLP-RGC logramos identificar 12 bandas polimórficas en los ecotipos de cocotero que fueron evaluados (fig. 1). De estos 12 marcadores, 6 de ellos estuvieron presentes solamente en los ecotipos de cocotero resistentes al AL, mientras que los otros 6 fueron identificados en los susceptibles. Para la identificación de los polimorfismos se evaluó un total de 20 combinaciones de iniciadores, de los cuales solamente 4 mostraron bandas polimórficas. Los bajos números de polimorfismo obtenidos ya han sido reportados en otros estudios (Egea-Gilabert *et al.*, 2003). Los marcadores con los que actualmente contamos, serán clonados y secuenciados, se realizará el análisis bioinformático y se desarrollarán marcadores SCAR (secuencias amplificadas, caracterizadas y secuenciadas) que serán mapeados en las poblaciones segregantes resultado de la cruce entre ecotipos resistentes y susceptibles al AL.

Los marcadores moleculares que se logren desarrollar en este estudio, podrían ser aplicados para la selección de plantas resistentes a enfermedades desde la etapa de plántula, con alta precisión y con reducciones en su costo.

**FIGURA 1.**

Bandas polimórficas obtenidas con dos combinaciones de iniciadores. A) Combinación de iniciadores *Mse*1-CAT+PIA. B) Combinación de iniciadores *Eco*R1-AA+ P3A. Las flechas rojas indican las bandas polimórficas.

Así también, podría dar lugar a la generación de un programa de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares, enfocados hacia la generación de variedades resistentes a las principales enfermedades del cocotero.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto CONACYT con clave CB 129717.

C O N C L U S I O N E S

En este estudio se lograron identificar diferentes marcadores moleculares probablemente asociados con la resistencia al AL o quizás a otros patógenos que afectan al cocotero. Estos marcadores pueden ser aplicados para el desarrollo de mapas genéticos y la selección de características definidas como la resistencia a enfermedades en este cultivo.

R E F E R E N C I A S :

- DANGL, L, Jones, J. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411:826–833.
- EGEA-GILABERT, C., Dickinson, M.J., Bilotti, G., Candela, M.E. (2003). Isolation of resistance gene analogs in pepper using modified AFLPs. *Biol Plant*, 47:27–32.
- FOALE, M. (2005). An introduction to the coconut palm. In: Batugal P, Ramanatha V, Rao GP, Oliver J (eds.). *Coconut Genetic Resources*. International Plant Genetic Resources Institute–Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia. 1-8.
- GRIFFITH, R. (1978). Red ring disease of coconut palm. *Plant Dis*, 71:193–196.
- HANOLD, D., Randles, J.W. (1991). Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis*, 75:330–335.
- HARRISON, N.A., Richardson, P.A., Kramer, J.B., Tsai, JH. (1994). Detection of the mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 43: 998-1008.
- HAYES, A.J., Saghai, M.A. (2000). Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. *Theor Appl Genet*, 100:1279–1283.
- JOSEPH, T., Radha, K. (1975). Role of *Phytophthora palmivora* in bud rot of coconut. *Plant Dis Repr*.59:1014–1017.
- OROPEZA, C., Zizumbo-Villarreal, D. (1997). The history of lethal yellowing in Mexico. In: Eden-Green SJ, Ofori F, editors. *Proceedings of the international workshop on lethal yellowing-like diseases of coconut*. Ghana: Elmina. p. 69–76.
- PARTHASARATHY, M.V., Van Slobbe, W.G., Soudant, C. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. 1. Coconuts (*Cocos nucifera*). *Principes*. 22:3–14.

ROHDE, W., Randles, J.W., Langridge, P., Hanold, D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Viol.* 176:648–651.

SAMBROOK, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

VOS, P., Hogers, V., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, J., Pelman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids. Res.* 23:4407–4414.

ZIZUMBO-VILLAREAL, D., Colunga-García, M., Fernández-Barrera, M., Torres-Hernández, N., Oropeza-Salín, C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 156: 23-33.