

Caracterización de la variabilidad genética de siete materiales promisorios de especies de palmas

Characterization of the genetic variability from seven palm promising species

Ernestina Solórzano¹, Mayra Ramos², José Manuel Palma³ y Javier Corpas²

¹ Profesor Asistente. Dpto. Medio Ambiente, Facultad de Medio Ambiente, INSTEC, esolorza@instec.cu

² Profesor Titular. Dpto. Medio Ambiente, Facultad de Medio Ambiente, INSTEC

³ Profesor e investigador. Grupo de Antioxidantes, Radicales Libres y Óxido Nítrico en la Biotecnología, Alimento y Agricultura, Dpto. de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apartado 419, E-18080, Granada, España

RESUMEN

La introducción de especies exóticas invasoras incide y amenaza la biodiversidad. Dentro de ellas, el ácaro rojo de las palmas (*Raoiella indica*) (ácaro fitófago de origen asiático que recientemente invadió el hemisferio occidental) resulta de gran importancia, pues afecta a plantas como el plátano y el cocotero, y además amenaza las palmas, simbólicas, diversas y abundantes en Cuba. Debido a la determinación reciente de su presencia en mayor o menor proporción en palmas de los jardines botánicos de todas las provincias del país, el objetivo del trabajo fue realizar un estudio preliminar de la variabilidad a nivel bioquímico y molecular existente en siete materiales promisorios de palmáceas con diferente comportamiento frente a *R. indica*. Se ensayaron una batería de isoenzimas en un grupo de especies, que han resultado importantes en base a su comportamiento observado frente al ácaro, incluyendo en el análisis otros materiales susceptibles como referencia. Las plantas se mantuvieron en condiciones semicontroladas, y una vez realizados los muestreos se procedió a la extracción de proteínas totales para posteriormente realizar las determinaciones de actividad específica e isoenzimas con los materiales pertinentes. Esta etapa incluyó la estandarización de las técnicas referidas. Fueron analizados los siguientes sistemas isoenzimáticos: POX, APX, SOD, catalasas, descritos previamente por diferentes autores, describiéndose para cada uno de ellos patrones específicos con ligeras diferencias en la intensidad de bandas y en el número de ellas, aunque no en todos los sistemas, lo que sugiere incrementar el número de especies a analizar según el grado de infestación obtenido previamente y realizar su caracterización con el empleo de un mayor número de isoenzimas.

Palabras claves: *Raoiella indica*, POX, APX, SOD, catalasas, isoenzimas, RAPD.

ABSTRACT

Invasive exotyc species introduction impacts and threatens the biodiversity, one of them, *Raoiella indica* (mite phitophage from Asian origin who recently invaded the Western hemisphere) the red palm mite, have a great importance, because many plants species were affected such as bananas and coconut and also palms results threatened, symbolic, diverse and abundant in Cuba. Determination of its presence in greater or less proportion in palms species from botanical gardens of all provinces in Cuba was made so the objective of this work was to carry out a biochemical variability existing preliminary study in 7 promising palmeaceas materials with different degree of infection to *R. indica*. We tested a battery of isozymes in several species, which have been fundamental by the behavior observed in front of the mite related with their resistance, in the analysis was including other materials susceptible as a reference. The plants were kept in partial control cconditions and once made samplings, was proceeded to total protein extraction and subsequently was make the specific activity and isoenzymes determinations with the relevant materials. This stage included the techniques standardization. The following systems were analyzed POX, APX, SOD, CATALASES isoenzymes described previously by authors from different countries. Each of them described specific patterns with slight differences in the intensity of bands and in the number of them although not all. Results allowed differentiate some materials used which suggests increasing the number of species to be analyzed according to the degree of infestation previously obtained.

Key words: *Raoiella indica*, POX, APX, SOD, Catalases, isoenzymes, RAPD.

INTRODUCCIÓN

La introducción de especies exóticas invasoras incide y amenaza la biodiversidad, dentro de ellas el ácaro rojo de las palmas (*Raoiella indica*) (ácaro fitófago de origen asiático que recientemente invadió el hemisferio

occidental) resulta de gran importancia, pues afecta a plantas como el plátano y el cocotero, y además amenaza las palmas, simbólicas, diversas y abundantes en Cuba. *Raoiella indica*, calificada como especie exótica

invasora (EEI), fue registrada en la zona más oriental de Cuba desde 2008, también denominado ácaro rojo de las palmáceas (De la Torre y col., 2010). Su presencia en cocoteros, plátanos y bananos propició la realización de un proyecto de investigación y sus resultados permitieron el diseño de los elementos básicos para una estrategia de manejo. Como su nombre lo indica, su hábitat incluye a especies botánicas de la familia *Arecaceae*, de las que Cuba posee una diversidad significativa, representadas en particular en las colecciones de los jardines botánicos (Leiva, 1999), que pudieran constituir hábitat para este ácaro y por tanto estar amenazadas.

Debido a la determinación reciente de su presencia en mayor o menor proporción en palmas de los jardines botánicos de todas las provincias del país, el objetivo del trabajo fue realizar un estudio preliminar de la variabilidad a nivel bioquímico existente en materiales promisorios de palmáceas con diferente comportamiento frente a *R. indica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plantas de siete genotipos de palmas fueron tomadas de un invernadero donde crecen en condiciones controladas. Los genotipos seleccionados fueron los siguientes:

1. *Chamaedore atepijilote* Liebm.
2. *Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. ex Mart.
3. *Washingtonia filifera*
4. *Trachycarpus fortunei*
5. *Chamaerop shumilis*
6. *Phoenix canariensis*
7. *Acoelorrhaphe wrightii*

Cada uno de ellos posee un comportamiento frente a *R. indica*, según Ramos y col, 2016.

Extractos crudos de tejidos de plantas

Las hojas fueron congeladas con N_2 líquido y maceadas en un mortero en frío. Posteriormente el polvo fue homogenizado en un medio compuesto por 0,1 mM Tris-HCl; pH 7,8; 0,1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); 5 mM dithiothreitol (DTT); 10 % (v/v) glycerol and 0,2 % Tritón X-100. El homogenato fue pasado por vortex por 1 min y después se filtró por gasa en frío y pasado a tubos eppendorf. El extracto fue centrifugado 25 min at 15 000 rpm, 4 °C,

y el sobrenadante fue pasado por columna NAP-5 de intercambio iónico con Matriz de Sephadex G-25. La elución se realizó con la misma solución de extracción, y el sobrenadante se usó inmediatamente para los ensayos.

Ensayos isoenzimáticos

Se determinaron mediante la electroforesis nativa en geles de poliacrilamida (PAGE) como lo reportado por Ruiz y Naribona, 1983. Todos los sistemas isoenzimáticos fueron identificadas posteriormente. Las isoenzimas Superoxidodismutasa (SOD) fueron identificados con NBT y Riboflavina, según Beauchamp & Fridovich, 1971, citado por Corpas *et al.*, 2008. Las catalasas (Cat) fueron determinadas empleando como concentración de PA en el gel: 8 %. En la tinción de las catalasas se utilizaron DAB 0,5 mg/mL y H_2O_2 5 mM, disueltas en solución amortiguadora fosfato de sodio 0,05 M pH 7,0, luego de la incubación del gel en una solución de peroxidasa de rábano 50 μ g/mL. La tinción de las isoenzimas POX se realizó empleando una solución compuesta por diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno sobre el gel; se producen bandas carmelitas sobre un fondo claro (Adan y col., 1995). Las ascorbato peroxidases (APX) se determinaron incubando los geles en una solución de fosfato potásico 50mM pH 7 que contiene ascorbato 2mM y H_2O_2 0,5mM, el revelado se realizó empleando TEMED y NBT por 10 min hasta la aparición de bandas blancas sobre un fondo azul, según lo descrito por Bieker y col., 2012.

RESULTADOS

Ensayos isoenzimáticos

El análisis de isoenzimas permite diferenciar especies muy similares entre sí. La enzima catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) cataliza la ruptura del H_2O_2 .

La *Fig. 1* muestra el comportamiento de los siete genotipos frente a esta enzima, y la misma permite diferenciar entre genotipos, teniendo en cuenta el patrón de bandas obtenido. En general se observan dos bandas de diferente movilidad que están presentes en todos los genotipos con excepción de los genotipos 6 y 7, en los cuales se observa una sola banda ancha que bien pudiera suponer dos bandas con movilidad muy parecida.

La presencia de dos patrones de bandas diferentes evidencia cierto polimorfismo a catalasas de estas especies de palmas.

1. Catalasas isoenzimas

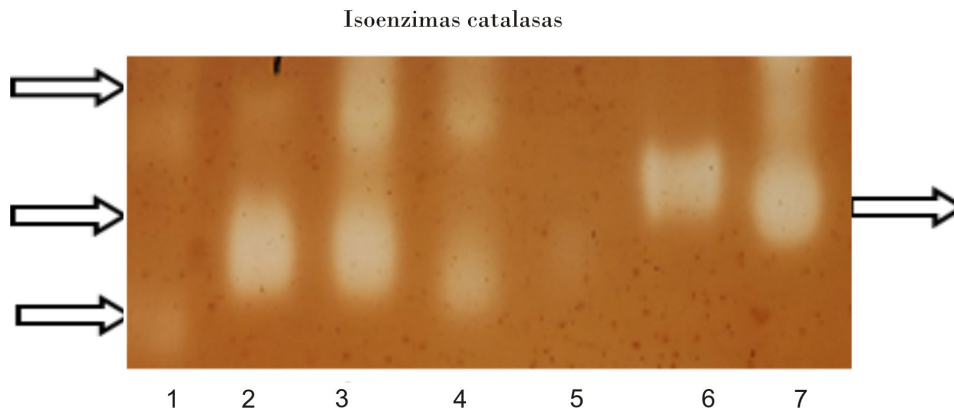


Figura 1. Comportamiento de la enzima catalasa frente a siete especies de palmas con diferente comportamiento frente a *R. indica*.

La Fig. 2 comprende el comportamiento de los genotipos en estudio con las isoenzimas SOD. Como puede apreciarse, estas isoformas resultaron polimórficas en estas especies de palmas, pues mostraron patrones variables en cuanto a la movilidad e intensidad de

las bandas en los genotipos estudiados, incluyendo al genotipo 5, que mostró un patrón específico con cinco bandas.

La SOD reduce el NBT por radicales superóxidos generados en el experimento. Se diferencian en CuZn, Mn y Fe.

2. Catalasas isoenzimas

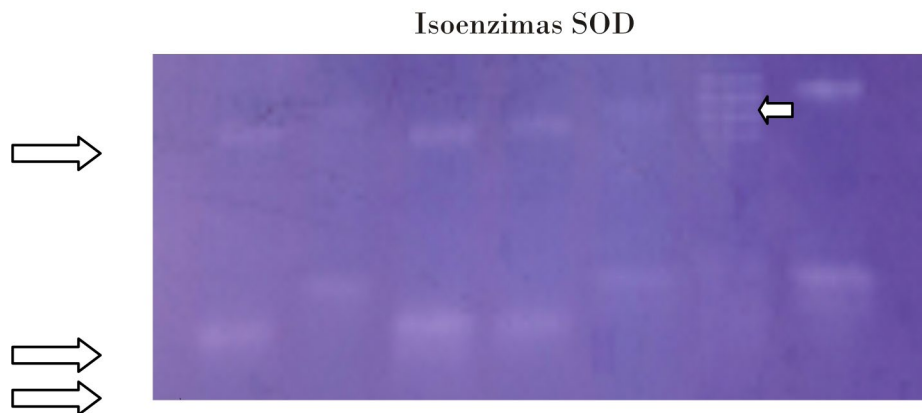


Figura 2. Comportamiento de la enzima SOD en siete especies de palmas con diferente comportamiento frente a *R. indica*.

En la Fig. 3 se observa el comportamiento con isoenzimas de ascorbato peroxidasas (APX) de los siete genotipos. Estas isoenzimas no resultaron polimórficas en estos genotipos, puesto que generaron solo

un patrón de bandas compuesto por dos bandas de movilidad parecida. Sin embargo, en el genotipo 7 se observa una tercera banda de menor intensidad que pudiera establecer diferencias entre ellos.

3. Isoenzimas APX

Isoenzimas Ascorbato Peroxidasas

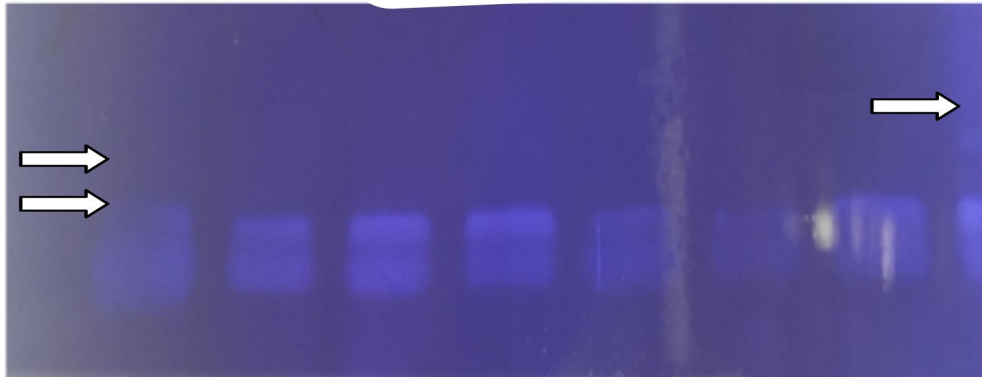


Figura 3. Comportamiento de la enzima APX en siete especies de palmas con diferente comportamiento frente a *R. indica*.

Las isoenzimas peroxidasas resultaron polimórficas para tres de los siete genotipos de palmas, como se observa en la Fig. 4. Se observan patrones de una, dos y tres bandas

de diferente movilidad. Resulta nuevamente interesante el comportamiento del genotipo 7 que resultó polimórfico para varios de los sistemas estudiados.

Isoenzimas peroxidasas

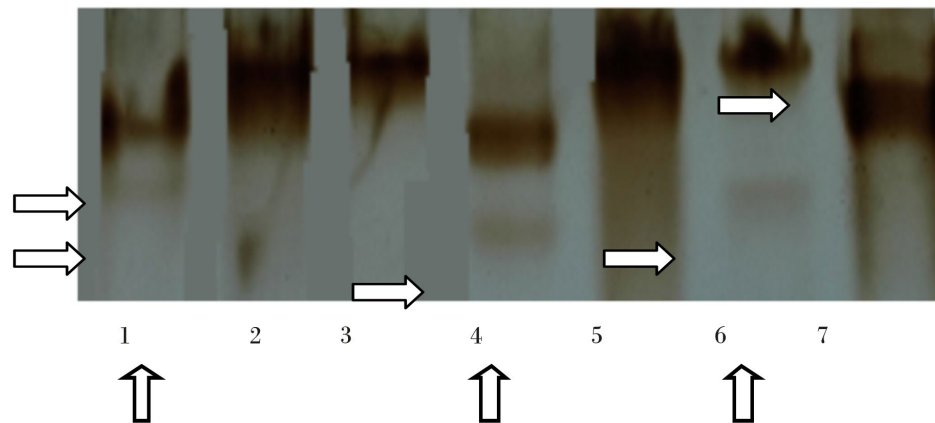


Figura 4. Comportamiento de la enzima POX en siete especies de palmas con diferente comportamiento frente a *R. indica*.

DISCUSIÓN

Los estudios en los patrones de enzimas contribuyen al conocimiento de la variabilidad de diferentes especies. Este análisis permite establecer diferencias no detectables desde el punto de vista morfológico (Estrada *et al.*, 1997). Por lo tanto, la variación isoenzimática en el nivel intraespecífico ha sido estudiada en varias especies con el fin de diferenciar poblaciones dentro de una especie o complejo de especies. Por ende, las

diferencias en los patrones electroforéticos son de gran importancia sistemática, pues además indican una variación en la estructura de las proteínas como un efecto directo de la variación génica entre taxones (Solís y Faloci, 2000).

Como conclusión ponemos mencionar que resultaron polimórficos tres de los cuatro sistemas isoenzimáticos estudiados, así como los análisis de PCR realizados.

Según trabajos anteriores, el efecto antrópico y las diferentes especies de palma son los aspectos más importantes que determinan la incidencia de *R. indica* en las palmas cubanas, otro elemento a tener en cuenta para los resultados obtenidos en este trabajo.

Existen isoenzimas como las peroxidasa y las α - y β - *Est*; están constituidas por un grupo complejo de proteínas asociadas con proteínas intracelulares específicas que muestran un total de ocho sitios polimórficos en el caso del tomate (Florido *et al.*, 2002). El marcado polimorfismo que se presenta en estos sistemas analizados ha sido informado también por otros autores al estudiar el nivel de poliploidía en clones de plátano (Román *et al.*, 1997), en el tejido foliar de tomate (Florido *et al.*, 2002) y en la caracterización de clones de yuca (Schmidt *et al.*, 2003), lo que ha permitido diferenciar accesiones en estos cultivos.

Dentro de las especies de palmas muestreadas están *L. chinensis* (2). Es importante señalar que además de estar presente en la mayoría de los jardines botánicos en Cuba, esta, entre otras, es de las especies que más se utilizan en jardines, parques y avenidas en nuestro país. De ahí la importancia de lograr una buena diferenciación entre las diferentes especies de palmas cultivadas. Estos criterios contribuirán a atenuar la presencia y la distribución de la plaga exótica.

Como mencionamos anteriormente, todos los sistemas empleados no resultaron polimórficos. Se reafirma entonces que no todos los sistemas tampones y procedimientos de extracción son efectivos para todas las enzimas de un tejido ni para todas las condiciones de laboratorio. Como ejemplo se puede citar a Ramírez *et al.* (1987), quienes probaron 16 sistemas isoenzimáticos en cinco tipos de tejidos de yuca y solo recomendaron α - y β - *Est* para la caracterización e identificación de duplicados de la colección del mencionado cultivo. Por ello pudiera inferirse que para las accesiones estudiadas solo pueden recomendarse los sistemas de peroxidasa, catalasa y SOD, independientemente de que debe probarse con otros que se hayan utilizado en diferentes cultivos. Al respecto, se conoce que las plantas requieren generalmente más de una isoforma de una enzima particular, de manera tal que se garantice una catálisis eficiente (Álvarez, 2005).

Asimismo, debe considerarse que las isoenzimas son de expresión génica y, por lo tanto, dependen del tipo de tejido y de su desarrollo; por ello la ausencia de bandas en los diferentes patrones isoenzimáticos no solo se debe

a las necesidades de esas enzimas en los diferentes tejidos, sino también a la comigración de proteínas y a la diferencia de zonas geográficas, pues a pesar de que la mayoría no son influidas por el ambiente, según Schmidt *et al.* (2003), los patrones electroforéticos de unos pocos sistemas (entre los que se incluye *Prx*, *Est*, *Aps*, *Sod* y *Cat*) pueden ser modificados por factores bióticos y abióticos, de manera tal que en esas condiciones se altere el funcionamiento de los genes que codifican para esas enzimas. De igual forma, debe señalarse que las isoenzimas también pueden variar según las especies que se evalúen, la edad, el manejo, el clima, la presencia o no de enfermedades y la posición del órgano que se muestrea, entre otros (Wencomo *et al.*, 2011).

Tanto de forma bioquímica como molecular, se encontraron patrones específicos con ligeras diferencias en el número y la intensidad de bandas.

Es válido señalar que el hecho de poder diferenciar especies de la familia *Arecaceae*, aunque no se lograra la diferenciación en su totalidad, constituye un valioso aporte a este tipo de estudio y al futuro desarrollo o no de *R. indica*, ya que en Cuba es muy común la presencia de palmáceas en parques, jardines y zonas turísticas; las personas acostumbran, además, a cultivar arecas en balcones y terrazas, así como para las áreas verdes de ornato, donde las diferentes especies de *Arecáceas* son abundantes, frecuentes y tienen un valor estético y económico en diferentes instalaciones, como por ejemplo las playas.

Estos resultados evidencian las bases de variación isoenzimática existente en el material evaluado y se corresponden, en general, con lo planteado por otros autores, quienes informaron acerca de la gran homogeneidad isoenzimática presente en el género *Arecaceae*; ello se corrobora con las investigaciones efectuadas por Rocha *et al.* (2006), que revelaron la presencia de un bajo nivel de polimorfismo, incluso al utilizar técnicas moleculares, como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y otras técnicas de caracterización.

A través de este estudio se pudo descartar la posibilidad de que existieran genotipos duplicados, lo cual hubiese sido imposible determinarlo a través de la caracterización y evaluación morfológica solamente. En este sentido sería útil aumentar el número de sistemas isoenzimáticos en el análisis con vistas a lograr mayor cobertura del genoma, entre ellos aspartato aminotransferasa (AAT), entre otros.

Por ello, se recomienda combinar los análisis morfoagronómicos y genético-bioquímicos para la caracterización de especies de palmas y otras especies con vistas a lograr un manejo integral exitoso de plagas y enfermedades, así como para hacer frente a la introducción de especies exóticas invasoras (EEI) como *R. indica*, y se recomienda continuar con la búsqueda de nuevas formas polimórficas del cultivo, incorporando, en lo posible, técnicas que detecten un mayor polimorfismo que permitan revelar la variación existente a nivel de ADN y contar con la variabilidad genética suficiente para explotar en especies del género *Arecaceae* de gran importancia en nuestro país. Se sugiere incluir un mayor número de accesiones de las especies poco representadas en este trabajo.

CONCLUSIONES

- Se evidenciaron diferencias en el patrón de bandas de los genotipos estudiados con los sistemas isoenzimáticos catalasas y peroxidasas, se pueden distinguir patrones distintos de isoenzimas en los materiales con porcentaje de infección por *R. indica*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del trabajo agradecen al CSIC y a su Programa ICOOP de 2015, específicamente, al COOPB2015 (Ref COOPB20171) por el apoyo para la realización de la estancia.

REFERENCIAS

- Adan, A. L.; C. S. Bestwick y J. W. Mansfield: "Enzymes regulation the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* Pv. Phaseoliola", *Planta* 1995, 19.7, 240-249.
- Álvarez, A.: "Análisis de la diversidad genética de variedades tradicionales de arroz (*Oryza sativa* L.) basado en marcadores morfoagronómicos y moleculares", Tesis en opción al Título de Máster en Biología vegetal. Mención Biología Vegetal, La Habana, Cuba, 2005.
- Bieker, S.; L. Riemer; M. Stahl; J. Franzaring y U. Zentgraf: "Senescence-specific alteration of hydrogen peroxide levels in *Arabidopsis thaliana* and oilseed rape spring variety *Brassica napus* L. cv Mozart", *J. Integr. Plant. Biol.* 2012, 54 (8):540.
- Coronado Morillo, Ana Cruz; Liseth Gómez-Beltrán; Iván Ávila-Morales; Ernesto Andrade y Yacenia Morillo-Coronado: "Caracterización molecular con microsatélites amplificados al azar (RAMs) de *Inchi* (*Caryodendron orinocense* K.), 2015, *Revista Colombiana de Biotecnología* 17 (1).
- Corpas, F. J. et al.: "Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions", *Plant Cell Physiol.*, 2008, 49(11):1711-22.
- De la Torre, P. E.; A. Suárez y A. I. González: "Presencia del ácaro *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) en Cuba", *Revista Protección Vegetal* 2010, 25(1):1-4.
- Estrada, M.; D. Piñon y M. Capote: "Variabilidad de las esterases de *Metarhizium anisopliae*", *Rev. Iberoam. Micol.* 1997, 14: 29-30.
- Florido, M. et al.: "Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon* spp.)", *Cultivos Tropicales* 23: 61, 2002.
- Leiva, A. T.: *Las palmas en Cuba*, Ed. Científico-Técnica, 1999.
- Maribona, R. H.; S. Korneva; A. Ruiz y S. González: "Obtention of sugarcane plants by tissue culture from different plant organs", *Proceeding XVIII Cong. ISCT*, 2. 610-621, 1983.
- Rocha, S.; J. Pedro; C. F. Prada; B. Rey; R. Leonardo y Ayala e M. Ivan: "Partial Biochemical Characterization of *Cenipalma Elaieis oleifera* Collection from Colombian", *Amazonas Palmas* 27 (3), 2006.
- Rodríguez, Y.; E. Pérez; E. Solórzano; A. R. Meneses y F. Fernández: "Peroxidase and polyphenoloxidase activities in tomato roots inoculated with *Glomus clarum* or *Glomus fasciculatum*", *Cultivos Tropicales*, Cuba, ene.-mar. 2001), v. 22(1) pp. 11-16.
- Román, M. J. et al.: "Caracterización isoenzimática de 17 clones diploides de plátano fruta *Musa* spp.", *Biología* 11:61, 1997.
- Schmidt, A. et al.: "Caracterización de clones de yuca (*Manihot esculenta*) mediante marcadores proteicos e isoenzimáticos", *Interciencia* 28:690, 2003.
- Singh, P.; S. Singh; S. P. Mishra y S. K. Bhatia: "Molecular Characterization of Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. Genes", *Genomes. Genomics* (2010). 4(1), 1-8.
- Solís, V. y M. Faloci: "Estudios biosistemáticos en el complejo *Turnera sidoides* L. (Turneraceae, Leiocarpae). II - Caracterización isoenzimática". Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Córdoba-UNNE, Argentina, 2000.
- Wencomo, Hilda B.; Alba Álvarez; O. Coto; Maykelis Díaz y R. Ortiz: "Caracterización morfoagronómica e isoenzimática de 23 accesiones de *Leucaena* spp.", *Pastos y Forrajes* 34(4), 2011.