

## Proyecto: Estudio de nematodos en palma de aceite

### Desarrollo de un método para el diagnóstico de la enfermedad del anillo rojo en palma de aceite

La enfermedad del anillo rojo - hoja corta en palma de aceite producida por el nematodo *Rhadinaphelenchus cocophilus* es una de las principales causas de pérdidas económicas de estos cultivos. Su sintomatología inicial es difícil de diagnosticar y es fácilmente confundida con otras enfermedades y desórdenes fisiológicos. Con el fin de identificar marcadores bioquímicos asociados con la enfermedad del anillo rojo en palma de aceite, los cuales puedan ser utilizados para su diagnóstico precoz, se adelantó un estudio preliminar, tendiente a estandarizar metodologías para la caracterización electroforética de isoenzimas en tejidos de palmas sanas y se compararon los patrones de isoenzimas en palmas sanas y enfermas. Este estudio constituye un primer intento en la utilización de isoenzimas como marcadores o indicadores de la interacción *Elaeis guineensis* / *R. cocophilus*, y está siendo desarrollado en Corpoica dentro del Convenio Cenipalma-Corpoica.

#### Materiales y métodos

##### Material vegetal

Muestras de tejido flecha (parte blanca), estipe (80cm al nivel del suelo y 20 cm al interior del estipe), folíolo (hoja 9 y 17), bajo meristemo (parte baja del meristemo apical), meristemo (apical), inflorescencia (indeterminadas) y raíces superficiales de palma africana de 5 años de edad. Para la comparación se utilizaron los tejidos folíolo, flecha y bajo meristemo de palmas sanas y palmas infectadas con *R. Cocophilus*. Todo este material fue procedente de la plantación Manuelita, ubicada en el municipio de San Carlos de Guaroa- Meta.

##### Extracción de enzimas

Se evaluaron 10 buffers de extracción diferentes, de los cuales se escogió el que produjo un menor grado de oxidación del extracto y una mayor actividad enzimática. Este buffer contenía Tris HCl 0.05 M pH 8.3, sacarosa al 20 %, PVP-40 al 5 %, Triton X-100 al 0.5%, 2-ME 14 mM y DTT. Se utilizó una relación peso de

tejido/volumen de buffer de extracción de 1/1 y 1/2. El extracto se centrifugó a 27000 g a 4°C durante 15 minutos y se tomaron 15-25 µl del sobrenadante para la electroforesis.

##### Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida del 10 y 12 %. Para la comparación de patrones electroforéticos entre palmas sanas y enfermas se utilizaron geles al 10 % puesto que presentaron una mejor resolución de bandas. La electroforesis se realizó en condiciones no denaturantes con 5 sistemas buffers diferentes, de los cuales se escogió un buffer discontinuo que produjo una mejor resolución de las bandas. El buffer del gel de concentración en éste sistema fue Tris HCl 0.5 M pH 6.8, el del gel de separación fue Tris HCl 1.5 M pH 8.8 y el buffer de electrodo fue Tris borato 0.05 M pH 9.0. La corrida electroforética se realizó a 50 V 20 min. y luego 100 V 20 min., 150 V 60 min., 200 V 20 min. y 250 V 120 min.

##### Revelado

Los 5 sistemas enzimáticos evaluados: Esterasa (EST), fosfatasa ácida (ACP), superóxido dismutasa (SOD), polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (PRX), se revelaron de acuerdo con los procedimientos estándar con algunas modificaciones.

##### Comparación de patrones isoenzimáticos entre palmas sanas y enfermas

Para el análisis comparativo de los patrones de isoenzimas en tejidos de palmas sanas y enfermas se utilizaron tejidos meristemáticos (región basal), flechas y folíolo, puesto que previamente se había determinado que la mayor actividad de isoenzimas se encontraba en estos tejidos. Para realizar esta comparación se tuvieron en cuenta diferencias con respecto a la presencia o ausencia de bandas y a la

intensidad de las mismas, para lo cual se utilizó la misma concentración de proteína en cada una de las muestras que fueron cargadas en el gel de poliacrilamida.

## Resultados y discusión

### Patrones de isoenzimas en palmas sanas y enfermas

El primer grupo de plantas sanas vs enfermas analizadas, las cuales pertenecían a una misma población genética, con edades similares y provenientes de un mismo lote, presentaron diferencias concernientes a la presencia de nuevas formas isoenzimáticas en tejidos de palmas enfermas y a su intensidad (la Tabla 1 resume estas diferencias).

Los patrones isoenzimáticos de EST, revelaron 3 isoformas nuevas en el tejido bajo meristemo (bandas 1,9 y 10, Figura 1D) y una en el tejido flecha (banda 3, Figura 2D). Para ACP se detectó una nueva banda en tejido flecha (banda 3, Figura 2A). Para PRX se detectaron cuatro isoformas nuevas en flecha (bandas 3,5,7 y 8, Figura 2B) y tres en el tejido bajo meristemo (Bandas 5,7 y 8, Figura 1B). Estas tres últimas bandas se acenturaron al utilizar una mayor concentración de proteína (Figura 3). En el patrón isoenzimático de PPO se observó un aumento en la intensidad de la banda 5 en tejido bajo meristemo (Figura 1C), y de las bandas 2 y 6 en flecha (Figura 2C). En bajo meristemo no se encontraron diferencias para la enzima ACP y en foliolo no se encontraron diferencias en los patrones electroforéticos de las isoenzimas evaluadas.

Las diferencias encontradas en estos 4 sistemas enzimáticos podrían ser un indicio de la posible participación de enzimas relacionadas con procesos oxidativos e hidrolíticos involucrados en el mecanismo de interacción *E. gui-*

*neensis*- *R. cocophilus*. Estos resultados también indican que es posible identificar cambios en los patrones de expresión de isoenzimas en palmas con síntomas de anillo rojo, los cuales no están presentes en palmas sanas, y por tanto, podrían ser utilizados como marcadores bioquímicos indicadores de la presencia de la enfermedad. Sin embargo, las anteriores diferencias no se observaron en tejidos de un segundo grupo de palmas sanas y enfermas provenientes de poblaciones diversas y lotes aislados. Es posible que existan diferencias en cuanto a la procedencia genética de estas palmas y/o en cuanto a condiciones ambientales y fisiológicas con respecto a las palmas del primer grupo.

Para evitar alteraciones en los patrones de isoenzimas por los factores expuestos anteriormente, es necesario llevar a cabo un ensayo biológico con palmas de la misma edad y procedencia genética en condiciones ambientales controladas.

### Conclusiones preliminares

- Se estandarizaron metodologías para la detección de patrones electroforéticos de las isozimas: EST, ACP, PPO, SOD y PRX.
- Se establecieron diferencias en los patrones isoenzimáticos de tejidos sanos y enfermos con respecto a la presencia de nuevas bandas en tejido enfermo y al aumento en la intensidad de bandas en tejido enfermo, previamente encontradas en tejido sano.
- Se encontraron inconsistencias en los patrones isoenzimáticos de los dos grupos de palmas sanas y enfermas evaluadas, posiblemente por diferencias en cuanto a su procedencia genética y/o factores fisiológicos y ambientales en las cuales fueron muestradas.

### Resumen de la comparación de patrones electroforéticos de esterasas, peroxidadas, polifeniloxidasas y fostasas ácidas en diferentes tejidos de palmas sanas y enfermas

Enzima	Tejido	Número de bandas totales	Número de la banda diferente en tejido enfermo	
			Por presencia	Por intensidad
EST	B. meristemo	10	1,9 y 10	
	Flecha	15	3	
PRX	Flecha	8	3,5,7 y 8	
	B. meristemo	8	5,7 y 8	
PPO	B. meristemo	8	5	
	Flecha	9	2 y 6	
ACP	Flecha	5	3	

Esta publicación ha sido financiada por el Fondo de Fomento Palmero.