

## Evaluación *in vitro* de la resistencia a las toxinas de *Mycosphaerella fijiensis* en *Musa* spp.

Carlos Giménez y Maribel Colmenares

Laboratorio de Biotecnología Vegetal (BioVeLUZ), Departamento de Biología,  
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526,  
Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 09-03-04 Aceptado: 08-09-04

### Resumen

La Sigatoka Negra es una de las enfermedades fungales más importantes que atacan a plátanos y bananos comerciales. Esta enfermedad es causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis*, que sintetiza un conjunto de toxinas que producen la necrosis del tejido foliar y disminuyen drásticamente la productividad y calidad de los racimos. Desde que fueron descritas estas toxinas, se presentó la posibilidad de utilizarlas en programas de mejoramiento para obtener plantas resistentes, sin embargo esto no se ha logrado. En esta investigación se propone una metodología para evaluar la resistencia a las toxinas de *M. fijiensis* en suspensiones de células del mesófilo de hojas de diferentes cultivares de *Musa* susceptibles y resistentes a la Sigatoka Negra en campo. Los resultados obtenidos muestran una buena correlación entre los datos reportados para la resistencia a la Sigatoka Negra en campo y los índices de toxicidad evaluados *in vitro*. Para los cultivares resistentes (Yangambi Km5 y FHIA-21) se obtienen niveles de tolerancia a las toxinas de 50 µg/mL, mientras que en los cultivares susceptibles (Williams y Pisang mas) las toxinas afectan la permeabilidad de la membrana a las 24 h de cultivo a una concentración de 0,05 µg/mL. Estos datos muestran que esta metodología podría ser una herramienta para estudios bioquímicos y genéticos de la interacción hongo – patógeno. También puede aplicarse para hacer selección masiva de posibles mutantes resistentes a la Sigatoka antes de estudios de campo.

**Palabras clave:** Células del mesófilo; *Musa*; *Mycosphaerella fijiensis*; sigatoka; toxinas.

## *In vitro* evaluation of *Musa* spp. cultivars for resistance to *Mycosphaerella fijiensis* toxins

### Abstract

Black Sigatoka is one of the most important diseases that affect commercial bananas and plantains. This disease is produced by the ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis*, which produces a group of toxins that cause tissues necrosis and severe reduction in quality and production of fruit bunch. Since the discovery and description of these toxins, a number of possible applications were attempted in order to produce resistant plants, however, no results have been accomplished. In this study a test was performed to evaluate the resistance of mesophyll cell suspensions to *M. fijiensis* toxins in both susceptible and resistant cultivars to Black Sigatoka, in

\* Autor para la correspondencia. Telf. +58261-7598109. E-mail: cagimenez@intercable.net.ve

field evaluations. These results demonstrated an excellent correlation between in vitro toxicity indexes and resistance to Black Sigatoka. Resistant cultivars (Yangambi Km5 and FHIA-21) support concentrations of 50 µg/mL of toxins while in susceptible cultivars (Williams and Pisang mas), toxins affect cell permeability in 0.05 µg/mL of toxins after 24 h. This data shows that this methodology would be useful for genetic and biochemical studies of plant-pathogen interactions and for possible selection of mutants resistant to Black Sigatoka before field test.

**Key words:** Mesophyll cell, *Musa*; *Mycosphaerella fijiensis*; sigatoka; toxins.

### Introducción

La Sigatoka Negra, producida por un hongo de la clase Ascomicete, especie *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es la enfermedad más importante que afecta la producción comercial de bananos y plátanos (*Musa* spp.) en la mayoría de las regiones productoras del mundo (1).

Esta enfermedad ataca principalmente a nivel foliar, en la etapa inicial se presentan síntomas de pequeñas manchas color café con borde amarillo, estas manchas paulatinamente van ampliándose, hasta que finalmente toda la hoja se necrosa. El daño ocasionado por el hongo, desde el punto de vista productivo, consiste básicamente en que el patógeno reduce la capacidad fotosintética de la planta, lo cual provoca una drástica reducción del rendimiento de la cosecha (2).

Las fitotoxinas producidas por el hongo *M. fijiensis*, agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra, constituyen un conjunto de 7 compuestos aromáticos: 1) 2, 4, 8-trihidroxitetralona, 2) la juglona, 3) el ácido 2-carboxi-3-hidroxicinámico, 4) el ácido dimetil éster 2-carboxi-3-hidroxicinámico, 5) el ácido isocracínico, 6) el 4- hidroxiscistalona y 7) la fijiensina, que causan la necrosis de la hoja en cultivares susceptibles a la enfermedad (3).

### Sistemas de Selección in vitro en presencia de las toxinas

Molina y Krausz (4), realizaron la extracción de toxinas de filtrados del hongo, con acetato de etilo y ensayaron la actividad fitotóxica de estos extractos sobre hojas de

plantas en vivero de 7 cultivares de *Musa* spp., encontrando al cultivar Gran Enano (AAA) como el más sensible a extractos de toxinas mediante un análisis comparativo del tamaño de la lesión de necrosis en la hoja.

Harelimana y col., (5), encuentran que existen diferencias en la susceptibilidad a las toxinas entre suspensiones de células del mesófilo, con un DL<sub>50</sub> de 25 µg/mL, mientras que en suspensiones de células embriogénicas el DL<sub>50</sub> es de 539 µg/mL del extracto de toxinas. Como conclusión, estos autores (5) proponen que los extractos de toxinas no son idóneos para la obtención de plantas resistentes mediante el uso de suspensiones embriogénicas y que probablemente se podría hacer una selección en tejidos fotosintéticos que son más sensibles a las toxinas.

Okole y Schulz (6) aplicaron el cultivo de micro secciones de rizomas (400 µm) de plantas de Plátano Hartón (AAB), Williams (AAA) y Petite Naine (AAA), con una doble presión de selección utilizando el filtrado crudo del hongo y la toxina 2,4,8-trihidroxitetralona purificada. En este ensayo *in vitro*, estos autores lograron la selección de plantas resistentes al hongo en condiciones de vivero inoculadas con suspensiones conidiales (4 x 10<sup>4</sup> conidio/mL) de *M. fijiensis*. Sin embargo, adicional a este reporte no se tienen informes del comportamiento de las mismas en campo.

En este trabajo, se reporta una metodología para la obtención de suspensiones de células del mesófilo de *Musa* spp. y se demuestra la correlación que existe entre la resistencia varietal en campo reportada para

la Sigatoka Negra y la resistencia *in vitro* de suspensiones de células del mesófilo a las toxinas de *M. fijiensis*.

## Materiales y Métodos

### Material Vegetal

Se utilizaron plantas mantenidas en condiciones de vivero de *Musa* spp. cultivares: Williams (AAA), Pisang mas (AA), FHIA 21 (AAAB) y Yangambi Km5 (AAA). Estos cultivares han sido caracterizados en campo respecto a su reacción a la enfermedad de la Sigatoka Negra (7) dentro de las evaluaciones que se les practica a los materiales que pertenecen al Banco de Germoplasma de Musáceas de la Facultad de Agronomía de la UCV (Tabla 1), coordinado por el Dr. O. Haddad.

### Material Fungal

Se utilizó una cepa monoascospórica de *M. fijiensis*, colectada en la región del Sur del Lago de Maracaibo.

### Mantenimiento de las cepas fungales en medio sólido

Para la multiplicación del hongo se inoculó una colonia en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) 39 g/L a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , y se cultivó en luz natural durante al menos 15 días. Luego para preservar el hongo en condiciones de bajo crecimiento se colocó en oscuridad a  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### Cultivo en medio líquido y extracción de las toxinas del hongo *M. fijiensis*

Para el cultivo del micelio del hongo *M. fijiensis*, se inocularon 50 mL de medio MID

(Tabla 2) (8), con una colonia de micelio de aproximadamente 200 mg y se cultivó durante un periodo de 30 días en luz natural a  $26 \pm 3^\circ\text{C}$  en agitación continua (160 rpm). Luego de los 30 días de cultivo, se separó el micelio del medio líquido por filtración con gasa estéril y se procedió a la extracción de los componentes fitotóxicos usando cloroformo 1:2 (v/v) como solvente orgánico. El proceso de extracción fue repetido dos veces cada 48 h. Después se combinaron los dos extractos y se evaporaron a 2 mL, a presión de vacío constante y a  $40^\circ\text{C}$ . Luego el extracto crudo se secó completamente en una cámara de flujo laminar en condiciones estériles, se pesó y diluyó en agua destilada estéril hasta lograr una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  (4). Estos extractos de toxinas fueron evaluados por cromatografía de capa fina y utilizados en todos los ensayos con suspensiones de las células del mesófilo.

### Evaluación de la toxicidad *in vitro* con extractos del hongo

Para la realización de los ensayos de toxicidad se siguió el procedimiento descrito por Harelimana y col., (5) con las siguientes modificaciones. Se utilizó 1 g de hojas de plantas de vivero para la liberación mecánica de células del mesófilo. Se cortaron finamente las hojas en un medio compuesto por las sales de Murashige y Skoog (9) (M&S) (Tabla 3), sin sacarosa. Se filtró a través de membranas de nylon de 30  $\mu\text{m}$  para eliminar restos celulares, luego se procedió a realizar tres lavados con medio M&S, centrifu-

Tabla 1  
Material vegetal. Cultivares de referencia de *Musa* spp.

Cultivar	Genoma	INSL*	Grado de infección*
Pisang mas	AA	50	4
Williams	AAA	33	5
Yangambi Km5	AAA	100	0
FHIA 21	AAAB	ND	ND

\* Evaluación respecto a resistencia a la Sigatoka negra en Bosque Seco Tropical a 450 m.s.n.m. (7).

INSL (Index of non spotted leaves): % de hojas no manchada. Grado de infección. Grado de infección a los seis meses. ND: no determinado.

Tabla 2  
Medio MID modificado (8)

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,20 mM
KNO <sub>3</sub>	0,79 mM
KCl	0,87 mM
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,00 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,14 mM
Tartrato de potasio y sodio	27,10 mM
Sacarosa	87,60 mM
Tiamina-HCL	0,59 mM
Mio-inositol	2,20 mM
FeCl <sub>3</sub>	7,40 µM
MnSO <sub>4</sub>	30,00 µM
ZnSO <sub>4</sub>	8,70 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	22,00 µM
KI	4,50 µM
Agua de Coco	20,00 mL/L
pH	5,8

gando las células a 1.000 g durante 10 min, en una centrifuga Eppendorff minispin en tubos de 1,5 mL.

Todas las suspensiones se ajustaron a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/mL y fueron incubadas en presencia de dos concentraciones del extracto de toxina (0,05 y 50 µg/mL). Luego de 24 h de incubación a luz natural,  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  con una agitación de 160 rpm, se realizó el registro de células vivas y muertas mediante el método de tinción con azul de Evans (10) (Figura 1). Se utilizaron 20 µL de suspensión de células, 2 µL de solución de azul de Evans (1% p/v) y se esperó 5 min antes de contar las células en un microscopio óptico con una cámara de Neubauer. Para el análisis de los resultados se desarrolló un índice de toxicidad para la estandarización de los datos, debido a que las suspensiones celulares de plantas diferentes no mostraron el mismo porcentaje de células vivas al inicio del experimento. Para el

Tabla 3  
Sales de Murashige y Skoog (9)

Sales	g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,50
KNO <sub>3</sub>	95,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,24
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,00
KI	0,17
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,05
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,005
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	88,00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	74,00
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4,46
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,72
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,005

cálculo del índice de toxicidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice toxicidad} = [(\% \text{ cel. vivas en control} - \% \text{ cel. vivas en toxina}) / (\% \text{ cel. vivas en toxina} + \% \text{ cel. vivas en control})] \times 100.$$

El índice de toxicidad es un valor que representa al porcentaje de células que han muerto por efecto del extracto de toxinas al momento del conteo. Este valor se obtuvo utilizando la diferencia porcentual de células vivas de la suspensión control (sin toxina) y las células vivas de la suspensión inoculada con el extracto de toxina, a las 24 h luego de iniciadas e inoculadas las suspensiones a partir de una misma suspensión madre.

Todos los ensayos de toxicidad se realizaron por triplicado y se aplicó un análisis de regresión simple para demostrar el grado de correlación estadística que existe entre los valores obtenidos en los ensayos *in vitro* en suspensiones celulares y las evaluaciones de resistencia a la Sigatoka Negra en campo.

## Resultados y Discusión

En esta investigación se utilizó un sistema *in vitro* donde se evaluó, mediante la tinción del citoplasma con Azul de Evans, la integridad de la membrana plasmática, la cual es afectada por las toxinas en mayor grado en los cultivares susceptibles que en los resistentes (Figura 1, 2, 3), obteniendo así una evidencia precoz de la muerte celular. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los cultivares resistentes son capaces de soportar concentraciones de toxinas hasta tres ordenes de magnitud mayor (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que las plantas susceptibles (0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figura 3). Adicionalmente, el índice de toxicidad calculado es 6 veces mayor en las plantas susceptibles que en las resistentes a concentraciones tan bajas como 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del extracto de toxinas (Figura 2).

Diferentes protocolos han sido utilizados para cuantificar el efecto nocivo de las toxinas de *M. fijiensis* en *Musa* (5, 11). Los ensayos en secciones de hojas inoculadas con extractos de las toxinas, son muy sencillos pero carecen de sensibilidad, por lo que se requieren grandes cantidades de toxina (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para obtener la necrosis. Comparaciones hechas con este tipo de ensayos muestran que los cultivares resistentes presentan síntomas de necrosis a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del extracto de toxinas mientras que los susceptibles presentan los síntomas a los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (11).

Otro protocolo para la selección precoz consiste en la medición de la liberación de electrolitos, producto de la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, en secciones de hojas infiltradas con el extracto de toxinas. Este método, no muestra una correlación con la resistencia a la Sigatoka Negra evaluada en campo mediante el índice de la hoja más joven manchada (5). En base a estos resultados estos autores proponen, que la reacción de hipersensibilidad del cultivar Yangambi Km5 no está relacionado con la resistencia a las toxinas de *M. fijiensis*, como en el caso de los cultivares Gran Enano (sus-

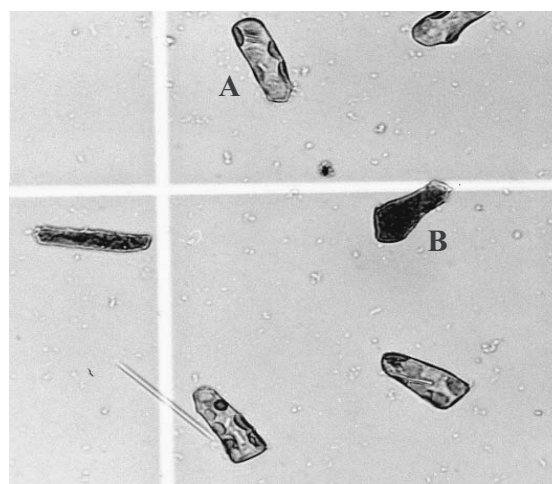


Figura 1. Suspensión de células aisladas del mesófilo de *Musa acuminata* cv. Williams (AAA) con Azul de Evans. A. Células vivas, B. Células muertas. 400 X.

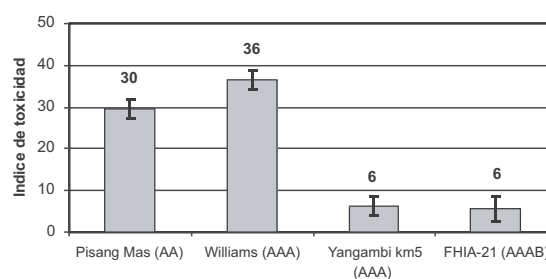


Figura 2. Índice de toxicidad a los metabolitos de *M. fijiensis* ensayado en suspensiones celulares del mesófilo de Pisang Mas (AA), Williams (AAA), Yangambi Km5 (AAA) y FHIA-21 (AAAB) (n= 3).

ceptible) y Fougamou (parcialmente resistente), en los que el desarrollo de la lesión se debe a la sensibilidad a las toxinas (5, 11).

Los resultados obtenidos en la presente investigación no están de acuerdo con los reportes previos (5, 11). Un análisis de regresión simple entre el índice de toxicidad y diferentes parámetros de evaluación de la resistencia a la Sigatoka en campo: grado de infección para el momento de la floración y

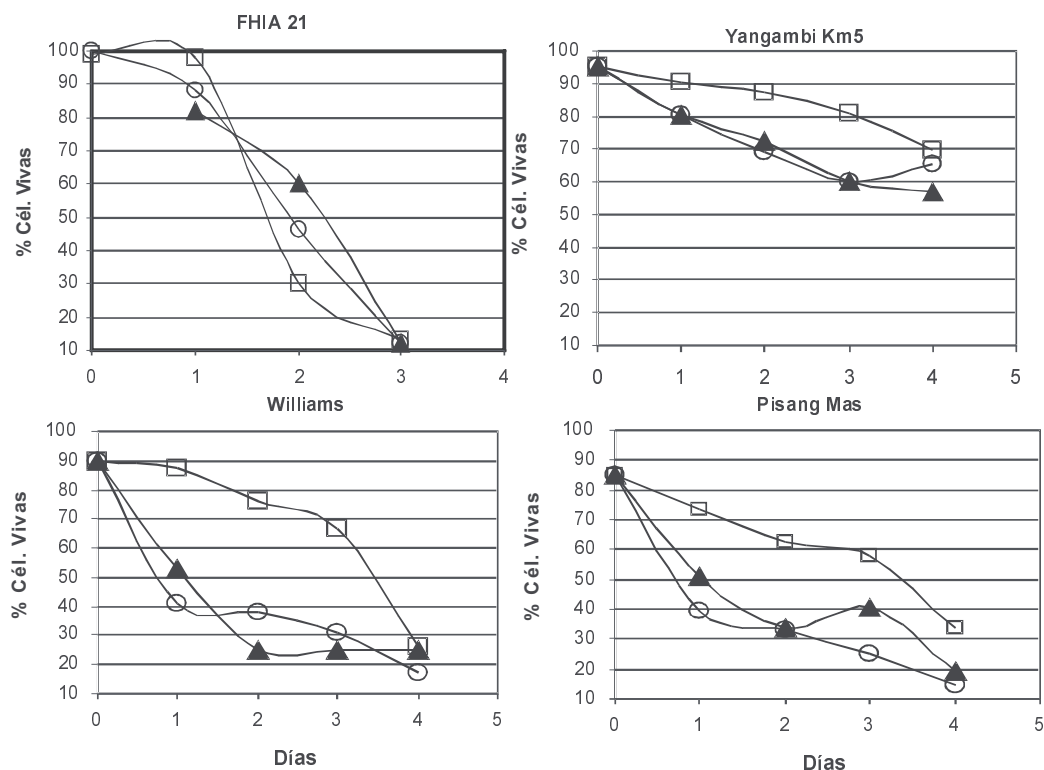


Figura 3. Porcentaje de células vivas en suspensión del mesófilo de, Pisang Mas (AA), Williams (AAA), Yangambi Km5 (AAA) y FHIA-21 (AAAB) con diferentes concentraciones del extracto de toxinas de *M. fijiensis*: Control --□--; 50 µg/mL --○--; 0,05 µg/mL --▲-- (n = 3).

el número de hojas no manchadas, muestran valores de  $R^2$  ajustado de 1 (Figura 4). El cultivar Yangambi Km5 al igual que el cultivar FHIA-21, presentan una resistencia a las toxinas de *M. fijiensis*, inclusive a concentraciones de 50 µg/mL del extracto, mientras que en los cultivares susceptibles la permeabilidad de la membrana se ve afectada con 0,05 µg/mL en 24 h de incubación.

Hoss y col., (12), proponen que en condiciones naturales en los cultivares resistentes como el Yangambi Km5 existen inductores de la biosíntesis de las toxinas en el hongo. Estos elevados niveles de toxinas, inducen en los tejidos de la planta, reacciones de necrosis, muerte celular con acumulación de compuestos fenólicos, deformación de los cloroplastos, etc., lo que dispara una reacción hipersensible que detiene el

crecimiento del hongo, quedando confinado este, en un pequeño grupo de células muertas que no es suficiente para cumplir su etapa biotrófica y como consecuencia el hongo muere. Sin embargo, cuando se aplican triclazoles a las plantas y se bloquean los pasos intermediarios de la biosíntesis de la melanina del hongo, se aumenta la concentración *in vivo* de la 2, 4, 8-trihidroxitetralona por encima de esta concentración letal. Esto induce una respuesta que sobrepasa la reacción hipersensible y dispara entonces la muerte celular y la necrosis en una mayor porción del tejido, creándose las condiciones que permiten el crecimiento biotrófico del hongo y su desarrollo en una lesión equivalente o de mayor tamaño a la producida en un cultivar susceptible (12). En nuestro sistema de células aisladas podemos separar el efecto de estos inductores, que al no estar

presentes en el modelo que proponemos para el estudio *in vitro* de la resistencia de las células de plantas resistentes a las toxinas de *M. fijiensis*, demuestra que las células del mesófilo del cultivar Yangambi Km5 son resistentes a las toxinas de *M. fijiensis*.

### Conclusiones

La evaluación de la toxicidad de los derivados del hongo *M. fijiensis* extraídos con cloroformo, en suspensiones de células del mesófilo, muestra una correlación con la resistencia en campo a la Sigatoka Negra a 450 msnm en condiciones de bosque seco tropical.

Las toxinas del hongo *M. fijiensis* afectan la permeabilidad de la membrana plasmática en los cultivares susceptibles Williams (AAA) y Pisang Mas (AA).

### Agradecimientos

Queremos agradecer al Dr. Oscar Haddad, del Banco de Germoplasma de Músicas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (U.C.V) por suministrar el material vegetal utilizado en esta investigación. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ No. 530-02) por el cofinanciamiento otorgado para la realización de esta investigación.

### Referencias Bibliográficas

1. FULLERTON R.A., STOVER R.H. Sigatoka leaf spot diseases of banana. *Proceeding of International workshop INIBAP*. San José, Costa Rica. pp 374, 1990.
2. STOVER R.H., DICKSON J.D. *FAO Plant Protection Bulletin* 24:36-42, 1976.
3. STIERLE A.A., UPADHYAY R., HERSHENHORN J., STROBEL G.A., MOLINA G. Research Articles. *Experientia* 47: 853-858, 1991.
4. MOLINA G., KRAUSZ J. *Plant Dis* 73(2): 142-143, 1989.
5. HARELIMANA G., LEPOIVRE P., JIJAKLI H., MOURICHON X. *Euphytica* 96(1):125-128, 1996.
6. OKOLE B.N., SCHULZ F.A. *Plant Cell Rep* 16: 339-343, 1997.
7. HADDAD O. *Informe al CONICIT proyecto de grupo* G-97000-700. pp 1-54, 2000.
8. PINKERTON F., STROBEL G. *P National Acad Sci USA*. 74: 4007-4011, 1976.
9. MURASHIGE T., SKOOG F. *Physiol Plantarum* 15: 443-97, 1962.
10. LEVINE A., TENHAKEN R., DIXON R., LAMB C. *Cell* 79: 583-593, 1994.
11. LEPOIVRE P., BUSOGORO J.P., ETAME J.J., HADRAMI A., CARLIER J., HARELIMANA G., MOURICHON X., PANIS B., RIVEROS A., SALLÉ G., STROSSE H.Y., SWENNEN R. *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*. (Eds Jacome L., Lepoivre P., Marin D., Ortiz R., Romero R. y Escalant J.V.). Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, pp. 151-158, 20-23 May 2002.
12. HOSS R., HELBIG J., BOCHOW H. *J Phyto-pathol* 148: 387-394, 2000.