

## Compuestos hidrofílicos en los filtrados de cultivos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* GCV [01210] inducen protección a hojas de plantas de banano frente al principal componente fitotóxico del patógeno

Nayanci Portal González<sup>1\*</sup>, Jenella Garraway<sup>1</sup>, Osbel Pino<sup>1</sup>, Ermis Yanes Paz<sup>2</sup>, Karlina García Sosa<sup>3</sup>, Barbarita Companioni<sup>2</sup>, Luis Manuel Peña Rodríguez<sup>3</sup>, Ramón Santos Bermúdez<sup>2</sup> \*Autora para correspondencia

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Cuba. e-mail: nayanci@agronomia.unica.cu

<sup>2</sup>Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Mérida. Yucatán. México.

### RESUMEN

El Mal de Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc), se encuentra entre las enfermedades más importantes de *Musa* spp. Foc es un hongo necrotrofico, sus fitotoxinas juegan un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad. Previamente se obtuvo un filtrado de cultivo (FCC) de 15 días de incubación con actividad fitotóxica diferencial frente a dos cultivares de *Musa*. A partir de este se purificó la principal fracción con actividad fitotóxica no específica frente a ambos cultivares. En el presente trabajo se determinó la actividad biológica de la fase acuosa y de la principal fracción fitotóxica purificada del extracto orgánico del FCC de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* GCV [01210] raza 1 sobre hojas de bananos cv. 'Gros Michel' (susceptible) y 'FHIA-01' (resistente). Se corroboró el efecto fitotóxico del FCC de Foc. La fase acuosa no mostró actividad fitotóxica sobre ambos cultivares, mientras que la aplicación simultánea de la fase acuosa con la fracción fitotóxica principal indujo una respuesta diferencial de los tejidos en los cultivares susceptible y resistente evaluados. Los resultados indicaron que los compuestos presentes en la fase acuosa se requieren para inducir la protección de los tejidos foliares frente al principal componente fitotóxico del patógeno.

Palabras clave: filtrado de cultivo, Mal de Panamá, resistente, susceptible

## Hydrophilic compounds in culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* GCV [01210] induce protection to banana leaf toward a main pathogen phytotoxic component

### ABSTRACT

Panama disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc), is among the most important diseases in *Musa* spp. Foc is a necrotrophic fungus, their phytotoxins play a role in disease development. Previously culture filtrate (FCC) 15 days incubation with differential phytotoxic activity against two *Musa* cultivars was obtained. From this, the main fraction with nonspecific phytotoxic activity against both cultivars was purified. In this study, the biological activity of the aqueous phase and the main phytotoxic fraction purified from organic extract of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* VCG [01210] Race 1 FCC was determined on banana leaves of cv. 'Gros Michel' (susceptible) and 'FHIA-01' (resistant). Foc FCC phytotoxic effect was confirmed. The aqueous phase showed no phytotoxic activity on both cultivars, while the simultaneous application of the aqueous phase with the main phytotoxic fraction induced a differential response of tissues in susceptible and resistant cultivars evaluated. The results indicated that the compounds present in the aqueous phase are required to induce the protection of leaf tissue against phytotoxic main component of the pathogen.

Key words: culture filtrate, Panama disease, resistant, susceptible

### INTRODUCCIÓN

Durante décadas, las toxinas hospedero-específicas o selectivas fueron los únicos

agentes conocidos de especificidad en cualquier interacción planta-microorganismo, pues provocan los síntomas de la enfermedad sólo en plantas que son

hospederas del patógeno que las produce. En ocasiones, la secreción de toxinas por parte del patógeno es esencial para la patogenicidad (Walton, 1996). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen (Foc) es un hongo necrotrófico (Ploetz, 2006). Las fitotoxinas en este microorganismo juegan un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad en las plantas susceptibles.

Varios estudios han demostrado la utilidad de emplear filtrados de cultivo (FCC) de especies de *Fusarium* para discriminar entre cultivares resistentes y susceptibles en ensayos con plantas *in vitro* o tejidos vegetales. En este sentido, Campanioni *et al.* (2003) informaron sobre un ensayo de punteadura en hojas con filtrados de cultivo de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* que permitió clasificar cultivares de *Musa* en base a su respuesta y asociarlo a fenotipos de resistencia a la enfermedad Mal de Panamá observados en condiciones de campo.

Más adelante, Portal *et al.* (2011) en estudios de caracterización del FCC de este patógeno refirieron que el extracto orgánico ocasionó una respuesta inespecífica de los tejidos de hojas de ambos cultivares. Cuando se purificó por cromatografía en columna flash y se recuperó en una sola fracción (2E) la referida actividad fitotóxica inespecífica se mantuvo. Dando continuidad a dichos estudios sobre la interacción de *Musa*-Foc, el objetivo del presente trabajo estuvo encaminado a determinar la actividad biológica de la fase acuosa y de la principal fracción fitotóxica purificada del extracto orgánico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] raza 1 (2E) sobre hojas de bananos susceptibles y resistentes a la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se emplearon muestras foliares de plantas de banano de ocho a nueve meses de plantadas en el Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT) de los cultivares 'Gros Michel' (*Musa* AAA) y 'FHIA-01' (*Musa* AAAB).

### *Cepa fúngica*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] (raza 1), procedente del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana.

### *Filtrado de cultivo*

Para la obtención del filtrado de cultivo se siguió el procedimiento descrito por Portal *et al.* (2007). De igual forma, el extracto orgánico, su fraccionamiento y la purificación de la fracción fitotóxica (2E) por cromatografía en columna flash se realizó según Portal *et al.* (2011).

El bioensayo de punteadura en hojas (Companioni *et al.*, 2003) se empleó para determinar la respuesta de los cultivares frente a la fracción acuosa (FA) y de la principal fracción fitotóxica purificada del extracto orgánico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* GCV [01210] raza 1 (2E).

Los tratamientos incluyeron la aplicación de las fracciones FA y 2E simultáneamente, así como la aplicación de la fracción 2E a los 15 y 30 min. del tratamiento con la fracción FA. Se utilizaron como control positivo el FCC de Foc GCV [01210] raza 1 de 15 días de incubación y concentrado al 80% de su volumen inicial, el extracto orgánico (1 mg ml<sup>-1</sup>), la fase acuosa (FA, 0.25 mg ml<sup>-1</sup> proteínas) y la fracción 2E (1mg ml<sup>-1</sup>). Una solución H<sub>2</sub>O:MeOH (9:1, v/v) se empleó como control negativo.

El contenido de proteínas totales en las hojas se determinó mediante el método de Lowry *et al.* (1951). El precipitado obtenido de la fracción acuosa se resuspendió en 2 ml de agua con Dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%. Alícuotas de 0.5 ml de la muestra se mezclaron con 6 ml de Reactivo C y 0.6 ml del Reactivo de Folin Ciocalteu diluido dos veces. Se determinó la A<sub>650</sub> transcurridos 60 min y la concentración de proteínas se expresó en mg ml<sup>-1</sup>, referido a una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA).

### *Análisis estadístico*

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS para Windows, versión 17, Copyright SPSS). La comparación de

medias se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la figura 1 se muestra la respuesta *in vitro* de los tejidos de las hojas plantas de *Musa* sp. susceptibles y resistentes al Mal de Panamá frente al FCC de 15 días de cultivo de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* GCV [01210] y sus componentes principales.

El bioensayo de punteadura en hojas empleado (Figura 1A) corroboró el efecto fitotóxico diferencial del FCC en la respuesta de los tejidos de hojas correspondientes a los

cultivares susceptibles y resistentes al patógeno *in vivo* (Figura 1B). Sin embargo, el carácter selectivo de los FCC no se observó en el extracto orgánico, el cual indujo daños sobre los tejidos de hojas de ambos cultivares.

Esta pérdida de especificidad se hizo más evidente en la fracción 2E, obtenida durante la purificación por particiones sucesivas con solventes orgánicos de polaridad variable y cromatografía en columna flash del extracto orgánico del FCC, asociado a una mayor pureza de la fracción fitotóxica. Esto supone la posible implicación de toxina(s) no-hospedero específica(s) como factor de patogenicidad y/o virulencia de este aislado del patógeno.

**A**

	Gros Michel	FHIA-01
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

**B**

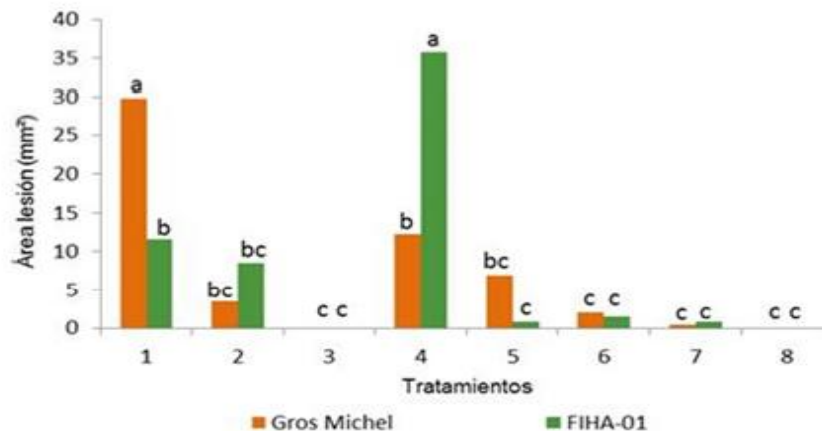


Figura 1. Respuesta de los tejidos de hojas de plantas del cultivar susceptible ‘Gros Michel’ y resistente ‘FHIA-01’ a la acción de: FCC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, GCV [01210] (1), Extracto orgánico del FCC (1 mg ml<sup>-1</sup>) (2), Fase acuosa del FCC (0.25 mg ml<sup>-1</sup> proteínas) (3), Fracción 2E (1 mg ml<sup>-1</sup>) (4), FA + 2E aplicados simultáneamente (5), FA + 2E aplicada 15 minutos posterior a la aplicación de FA (6), FA + 2E aplicada 30 minutos posterior a la aplicación de FA (7), H<sub>2</sub>O:MeOH, 9:1 (v/v) (8). Medias con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ).

De este modo, la fracción responsable de inducir la respuesta diferencial mostrada por los tejidos de las plantas resistentes al patógeno *in vivo* frente a la acción del FCC fue excluida en la fase acuosa durante la purificación de la fracción fitotóxica 2E. Adicionalmente, la fase acuosa no ejerció efecto fitotóxico alguno sobre ambos cultivares ensayados, indicando que la actividad fitotóxica total de los FCC fue recuperada en el extracto orgánico.

La aplicación conjunta de la fracción acuosa resultante de la partición del filtrado crudo de cultivo y la fracción 2E purificada a partir del extracto orgánico, mostró la especificidad mostrada por el filtrado de cultivo de *Foc* de 15 días de incubación en la respuesta de los cultivares frente al componente fitotóxico ensayado, similar a la respuesta de las plantas frente al patógeno *in vivo*, aunque sin diferencias significativas en el daño ocasionado sobre ambos grupos de plantas. Sin embargo, con la aplicación de la fracción 2E a intervalos de 15 y 30 min posteriores a la aplicación de la fracción acuosa, se redujo el daño causado también sobre los tejidos foliares del cv. susceptible. Esta respuesta retardada, en lugar de una carencia en el reconocimiento inicial de componentes del patógeno, parece operar en la respuesta de susceptibilidad en este patosistema.

El aislamiento y caracterización de estas moléculas hidrofílicas pudiera aportar nuevos elementos para el entendimiento de los mecanismos de respuesta de las plantas a los patógenos potenciales, y en especial en la interacción *Musa* sp. – *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Varios autores atribuyen un papel determinante a los productos de genes de avirulencia del patógeno o proteínas efectoras en la resistencia de las plantas a las enfermedades (Rep *et al.* 2005; Boller, 2008; Stergiopoulos y De Wit, 2009; Catanzariti y Jones, 2010; Zhang y Zhou, 2010).

Adicionalmente, los resultados sugieren tener en consideración, para futuros estudios de la interacción *Foc* – *Musa* sp. basados en la expresión génica y de las sendas de traducción de señales, enmarcar los procedimientos analíticos durante los primeros 30 minutos de exposición de los tejidos de las plantas a la acción de estas moléculas protectoras de la acción de componentes fitotóxicos del patógeno.

## CONCLUSIONES

Se comprobó que la fase acuosa, resultado del fraccionamiento del FCC de *Foc*, no tuvo efecto fitotóxico sobre hojas de los cultivares susceptible ('Gros Michel') y resistente ('FHIA-01') al Mal de Panamá en el ensayo de punteadura en hojas. Sin embargo, los resultados indicaron que los compuestos presentes en ella se requieren para inducir la protección de los tejidos foliares frente al principal componente fitotóxico del patógeno.

## REFERENCIAS

- Boller T (2008) Stabbing in the BAK—An Original Target for Avirulence Genes of Plant Pathogens. *Plant Science*: 5-7
- Catanzariti AM, David A Jones (2010) Effector proteins of extracellular fungal plant pathogens that trigger host resistance. *Functional Plant Biology* 37: 901–906
- Companioni B, Arzola M, Rodríguez Y, Mosqueda M, Pérez MC, Borrás O, Lorenzo JC, Santos R (2003) Use of culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, race 1 filtrates for rapid and non-destructive *in vitro* differentiation between resistant and susceptible clones of field-grown banana. *Euphytica* 130: 341-347
- Ingle A, Ingle R (2013) Isolation and Identification of *Fusarium oxysporum* infecting *Musa* plants in Maharashtra region and their molecular characterization. *Asiatic J Biotechnology Resources* 4 (1):28-34
- Ploetz RC (2006) *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96: 653-656
- Portal N, Companioni B, Achade C, Mvila B, Arzola M, Persaud I, Acosta-Suárez M, Sánchez-García C, Leiva-Mora M, Roque B, Alvarado-Capó Y, Santos Ramón (2007) Evaluación de la actividad fitotóxica sobre plantas de *Musa* spp. y contenido de proteínas totales de filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. *Biotecnología Vegetal* 7(3): 181 – 186
- Portal N, Companioni B, Achade C, Mvila B, Arbola M, Persaud I, Acosta M, Sánchez C, Roque B, Alvarado Y, Yanes E, Santos R (2009) Evaluación de la Actividad fitotóxica sobre plantas de *Musa* sp. y contenido de proteínas totales de filtrados de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. *Biotecnología Vegetal* 7(3):181-186

Portal N, García K, Iglesias A, Garraway J, Companioni B, Peña LM, Santos R (2011) Purificación de metabolitos fitotóxicos a partir del filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* gcv 01210 (raza 1). Biotecnología Vegetal 11(2):99–106

Rep M, M Meijer, P M Houterman, H C van der Does, B J C Cornelissen (2005) *Fusarium oxysporum* Evades I-3-Mediated resistance without altering the matching avirulence gene. MPMI 18 (1):15–23

Stergiopoulos I, PJGM De Wit (2009) Fungal effector proteins. Annu Rev Phytopathol 47:233–63

Walton J D, Daniel G P (1996) Host-selective toxins and disease specificity: Perspectives and progress. Annu. Rev. Phytopathol 31:275-303

Zhang J, JM Zhou (2010) Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. Molecular Plant (3)5: 783–793

Recibido: 19-2-2014

Aceptado: 11-7-2014