

ALELOPATÍA Y SUSTANCIAS BIOACTIVAS

Evaluación del efecto fisiológico de los metabolitos fitotóxicos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Evaluation of the physiological effect of phytotoxics metabolites of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Michel Leiva Mora, Jean Pierre Bussogoro, Phillipe Lepoivre.

1. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

E-mail: michel@ibp.co.cu

RESUMEN. El desarrollo de bioensayos sencillos y repetibles, que permitan evaluar el comportamiento de diferentes genotipos frente al agente fitopatógeno o derivados del mismo, permite de forma rápida estudiar algunas de las propiedades fisiológicas de la especie afectada, que se ven comprometidas durante el desarrollo de una enfermedad. A partir del filtrado de cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, se han aislado ocho componentes diferentes. El metabolito Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone), además de su efecto fitotóxico, ha permitido seleccionar genotipos con diferentes niveles de resistencia. En el presente trabajo se logró estandarizar un método para obtener una suspensión de cloroplastos íntegros, a partir del cv Gran enano (susceptible). Se pudo establecer un bioensayo para evaluar la integridad fisiológica en estos organelos, basado en la evolución de la absorbancia a 595 nm de una suspensión de cloroplastos que contenía DCPIP 10 mM. Se comprobó la influencia de la luz en la disminución del poder reductor de la suspensión de cloroplastos mediante la reducción del DCPIP a través de la evolución de la absorbancia a 595 nm. La concentración de 60 mg/mL del metabolito Juglone, provocó una lenta disminución de la absorbancia respecto al testigo, debido al desacople en las cadenas de transporte electrónico a nivel de cloroplastos, con la consiguiente pérdida del poder reductor. Este bioensayo pudiera utilizarse para el estudio de factores abióticos que provocan estrés oxidativo a nivel de cloroplastos.

Palabras clave: Bioensayos, Sigatoka negra, suspensión de cloroplastos, toxinas.

ABSTRACT. The development of simple and reliable bioassays for evaluating the response of different genotypes to plant pathogens or its derivatives; let us the study of some physiological properties of hosts during the plant infection process. From the culture filtrate of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, has been isolated several phytotoxic compounds. Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) is the best characterized of all, and this toxins has been used to discriminate *Musa* genotypes with different level of resistance to *M. fijiensis*. In this paper was standardized a method to obtain a functional chloroplast suspension from healthy leaves of Grande naine (susceptible). It was possible to perform a biological bioassay to evaluate the physiological integrity of chloroplast suspension based on reduction of the Hill reaction (10 mM of DCPIP, dichloride-phenyl-phenol-indol) by monitoring the reaction at 595 nm. It was probed with that bioassay the effect of light in decreasing the reductive power of chloroplast suspension expressed as a decrease in absorbance at 595 nm. The concentration of Juglone (60 mg/mL), induced a low decrease in the reductive power of chloroplast suspension respect to control without toxin, due to the uncouple effect of juglone in electronic transport in photosynthetic apparatus. This bioassay could be used also in the study of other factor related with oxidative stress at chloroplast level.

Key words: Bioassays, Black leaf streak, chloroplast suspension, toxins.

INTRODUCCIÓN

El entendimiento del mecanismo de acción de los metabolitos fitotóxicos de varios agentes fitopatógenos, ayudan a una mejor comprensión de los procesos bioquímicos y fisiológicos que están comprometidos en la interacción entre el patógeno y los tejidos de la planta.

Jack *et al* (2000), logró separar mediante cromatografía de columna, cuatro componentes del filtrado de cultivo de *Mycosphaerella fijiensis*, con similar actividad biológica. Basado en los bioensayos para la inducción de necrosis foliar y la medición de la fluorescencia clorofílica se determinó que el

metabolito Juglone permitió reproducir la respuesta diferencial entre los cultivares Gran enano (susceptible) y Fougamou (parcialmente resistente).

Harelimana (1997) comprobó la dependencia entre la respuesta a Juglone (5-hidroxy-1,4-naphthoquinone) y la iluminación. En estudios de microscopía electrónica, se observó el hinchamiento de los cloroplastos del cultivar Gran enano (AAA). El mismo fue inoculado con diferentes concentraciones de Juglone en presencia de luz, sugiriéndose los cloroplastos como sitio de acción de este metabolito.

En general, realizar bioensayos basados en las propiedades de algunos organelos celulares requiere de métodos engorrosos para su evaluación; sin mencionar el riesgo de que la integridad de los mismos pueda verse comprometida. Los objetivos del trabajo fueron: desarrollar un método que permita obtener una suspensión de cloroplastos con una adecuada integridad fisiológica, evaluar el efecto fisiológico a nivel de cloroplastos del Juglone bajo condiciones de oscuridad e iluminación y valorar el efecto de diferentes fracciones del contenido intercelular de cultivares inoculados en condiciones de invernadero con las estructuras del agente causal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas del cv Gran enano de seis meses de aclimatación en condiciones de invernadero. La segunda y tercera hojas fueron utilizadas para obtener la suspensión de cloroplastos, según las indicaciones del protocolo propuesto por Busogoro (1999).

Con la ayuda de un hematocímetro, se ajustó la concentración de la suspensión de cloroplastos a un valor aproximado de 14×10^6 cloroplastos/mL.

Se utilizó un espectrofotómetro de marca SECOMAN de seis portacubetas. Se ajustó a 595 nm la longitud de onda y la absorbancia fue registrada para cada tratamiento. Se utilizó como

referencia 891 mL de la suspensión de cloroplastos. Para el tratamiento control además de 891 mL de la suspensión de cloroplastos, se le adicionaron 99 mL de una solución de metanol al 10 % y 200 mL de una solución de DCPIP 1 mM. Los tratamientos consistieron en 891 mL de la suspensión de cloroplastos, 99 mL de la solución de Juglone (60 ppm) o 99 mL de extractos del contenido intercelular del cultivar Pisang Berling.

Se empleó la cepa I1 perteneciente a la colección de cultivo del CIRAD-FHLOR (Montpellier, Francia) y se utilizó la metodología descrita por Leiva et al (1998) para efectuar la inoculación en condiciones de invernadero. Se utilizó el clon Pisang Berling (AAB) como material vegetal.

Para cada tratamiento así como el control se emplearon un total de 5 réplicas. Se midió la absorbancia a diferentes intervalos de iluminación (0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min). Como fuente de iluminación se utilizó una lámpara incandescente de 60 W. Las cubetas fueron iluminadas a una altura de 30 cm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se pudo desarrollar un método sencillo y reproducible para obtener una suspensión de cloroplastos con una adecuada integridad fisiológica, los datos finales de absorbancia en los tratamientos testigos así lo comprueban (figura 1, 2 y 3). Este procedimiento puede ser utilizado para cualquier bioensayo que pretenda estudiar el comportamiento de los cloroplastos ante factores estresantes (elevada iluminación, déficit hídrico, influencia de toxinas o derivados fitotóxicos de agentes fitopatógenos, entre otros), que puedan ocasionar alteraciones en sus propiedades fisiológicas y bioquímicas.

Se pudo corroborar lo descrito por Harelimana (1997), acerca de la influencia de la luz sobre los procesos redox a nivel de cloroplastos (figura 1). Se observó que en el tratamiento con iluminación artificial, disminuyó la absorbancia respecto a las condiciones de oscuridad total, lo cual confirma que el poder reductor de la suspensión de cloroplastos,

monitoreado a través de la reducción del DCPIP, sólo se expresa en presencia de la luz.

Se observó el efecto inhibitor del metabolito Juglone (60 ppm) respecto al testigo, sobre los eventos redox desarrollados en los cloroplastos (fig. 2). La lenta disminución de la absorbancia, pudo ser el resultado de la pérdida del poder reductor, debido a la inhibición del transporte electrónico a nivel de cloroplastos, ocasionada por la presencia del juglone. Algunos autores señalan la capacidad de este metabolito de captar electrones y generar la formación de radicales libres, plenamente justificada con la estructura de esta molécula (hidroquinona).

Se observó que los extractos intercelulares de las hojas del cultivar Pisang Berling (AAB) sin inocular, lograron reducir de modo sostenido la densidad óptica en las distintas evaluaciones, respecto a los extractos intercelulares de hojas del mismo cultivar, inoculadas con *M. fijiensis* (I1) (fig. 3). La lenta disminución de la absorbancia en este último, confirmó la presencia de Juglone en los espacios intercelulares de las hojas inoculadas. Se corroboró lo planteado por varios autores respecto a la síntesis de toxinas del agente causal de la Sigatoka negra Strovel.

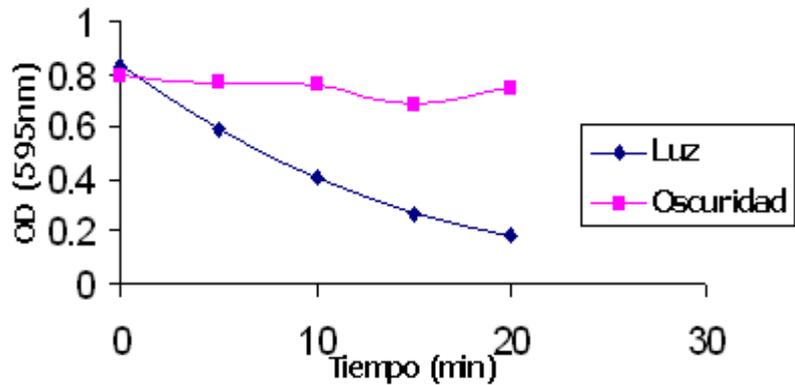


Figura 1. Evolución de la absorbancia de los cloroplastos del banano Gran enano en diferentes condiciones de iluminación

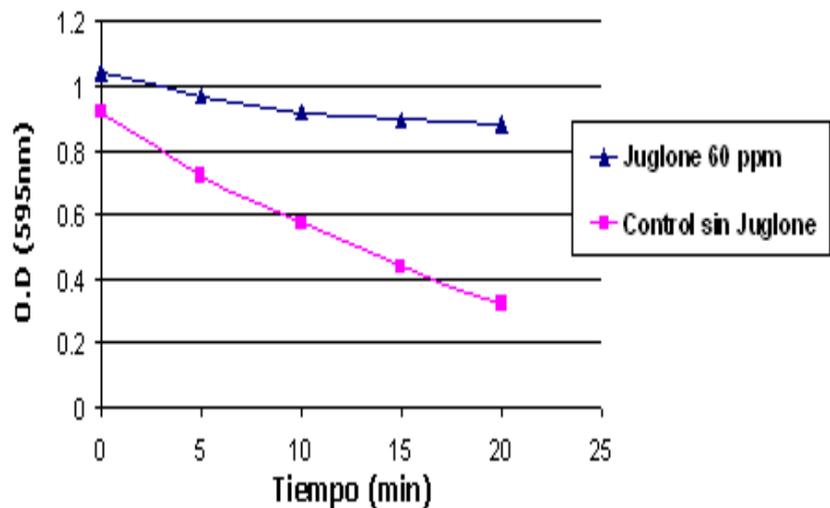


Figura 2. Efecto del Juglone (60 ppm) en la integridad de la suspensión de cloroplastos en el banano Gran enano

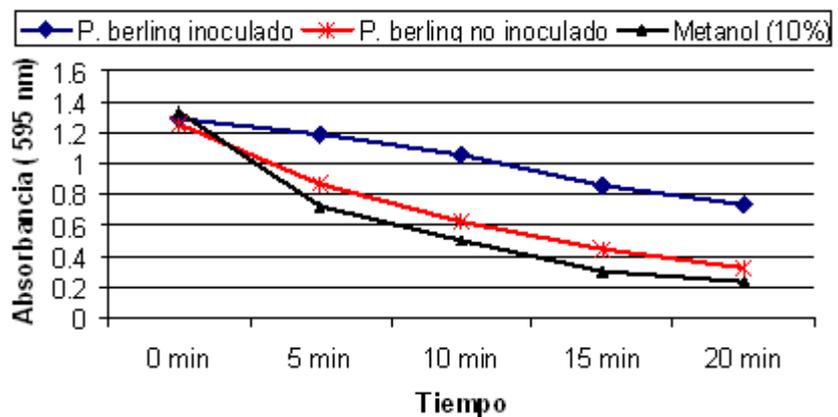


Figura 3. Efecto de diferentes extractos intercelulares obtenidos desde el cultivar *P. berling* en la evolución de la absorbancia

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, J. F. and N.G. Holmes: Electron transport and redox tritation. in Hipkins M.F and Baker N.R. (eds), Photosynthesis energy transduction. A practical approach. IRL Prees, Washinton, pp. 103-141, 1986.
2. Harelimana, G.; P. Lepoivre; M.J. Jijakli and X. Mourichon: "Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak," *Euphytica* 96(1): 125-128, 1997.
3. Busogoro, J.P.; J.J. Etame; G. Lognay; P.V. Cutsem and P. Lepoivre: "Selection for banana resistance to Black Leaf Streak disease," *Infomusa* 8(2): 15, 1999.
4. Leiva, M.M; R.M. Ditta y Yelenys Alvarado Capó: Estudios biológicos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, para el establecimiento de una metodología de selección en condiciones de invernadero, Tesis de Grado, UCLV, 1998.

Recibido: 21/diciembre/2007

Aceptado: 12/junio/2008