

Determinación de la concentración adecuada de Juglone para diferenciar dos cultivares de *Musa* spp.

Michel Leiva Mora*, Jean Pierre Bussogoro, Phillipe Lepoivre *Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 ½. Santa Clara Villa Clara. Cuba. e-mail: lmichel@uclv.edu.cu

RESUMEN

La producción de toxinas por patógenos fungosos puede facilitar la penetración y la colonización del tejido hospedero así como reproducir fielmente los síntomas característico de una enfermedad. El Juglone es el principal metabolito con acción fitotóxica, caracterizado a partir del filtrado de cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. En el presente trabajo se utilizaron concentraciones de 10, 25, 50 y 100 mg.l⁻¹ de este compuesto y se empleó como control una solución de metanol al 10%. Se realizaron inyecciones foliares en el envés de las dos últimas hojas abiertas de plantas aclimatizadas durante cinco meses de los cultivares Gran enano (AAA) y Fougamou (ABB) y se evaluó a las 24 horas el porcentaje de necrosis foliar por planta. Con la concentración de 100 mg.l⁻¹ se obtuvieron síntomas de necrosis foliar en las hojas inyectadas de ambos cultivares, sin embargo la concentración de 50 mg.l⁻¹ fue la única que permitió establecer diferencias claras entre los mismos. Este resultado permitió establecer una concentración adecuada para la diferenciación de cultivares de *Musa* spp. con diferentes niveles de resistencia frente al agente causal de la Sigatoka negra, mediante el empleo del juglone.

Palabras clave. *Mycosphaerella fijiensis*, rayado negro de la hoja, selección, toxinas

ABSTRACT

The toxins production by fungal pathogenic can enhance penetration and colonization of the host tissues and reproduce symptoms of diseases. Juglone is the main and the most toxic metabolite characterized from the culture filtrate of *Mycosphaerella fijiensis*. In the present work it was used different concentrations of juglone (10, 25, 50 and 100 mg.l⁻¹) and a control solution of methanol 10%. Foliar injections were performed in the underside of two last open leaves of Grande naine (AAA) and Fougamou (ABB) cultivars. The percentage of necrosis per plant was evaluated at 24 hours after the injection. The concentration of 100 mg.l⁻¹ was able to produce necrotic symptoms in both cultivars; nevertheless with the 50 mg.l⁻¹ was possible to obtain differences between the two cultivars. This result established a concentration for screening two *Musa* spp cultivars with different resistance levels to Black Leaf Streak by the use of juglone.

Key word: banana leaf streak, *Mycosphaerella fijiensis*, selection, toxins

INTRODUCCIÓN

La raya negra de la hoja, o Sigatoka negra, como se conoce en el continente americano, es una de las enfermedades más importantes que atacan la superficie foliar de los plátanos bananos, produciendo grandes pérdidas del área fotosintética tanto por la acción del patógeno como de las toxinas difundidas por el mismo (Mourichon, 2000)

Alrededor de cinco compuestos tóxicos han sido aislados y caracterizados a partir del filtrado de cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* (Upadhyay *et al.*, 1990, Stierle *et al.*, 1991). El juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) ha manifestado la mayor actividad biológica, induciendo necrosis foliar en varios cultivares de bananos, es por ello que actualmente constituye la toxina mejor estudiada y caracterizada de este patógeno (Molina y Krausz, 1988).

El empleo de toxinas fúngicas ha sido propuesto para la selección *in vitro* de bananos resistentes a la Sigatoka negra como una alternativa en los actuales programas

de mejoramiento genético (Escalant, 1990). Los materiales resistentes referidos hasta la fecha, se han obtenido mediante la selección de callos de tejidos de bananos expuestos a diferentes concentraciones del filtrado de cultivo de *M. fijiensis* (Okole y Schulz, 1997), sin embargo no se han realizado estudios de selección en condiciones de invernadero o campo mediante las toxinas purificadas.

Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo tuvo como principal objetivo la determinación de la concentración adecuada de Juglone para diferenciar dos cultivares de *Musa* spp, propagados por métodos biotecnológicos y aclimatizados en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central "Martha Abreu" de las Villas y en la Unidad de Patología Vegetal perteneciente a la Universidad Agrícola de Gembloux (Bélgica). El mismo

se efectuó en el período comprendido desde Septiembre del 2000 hasta Abril del 2001.

Material vegetal y condiciones de incubación

Se utilizaron plantas producidas *in vitro* de los cultivares Fougamou (ABB) (parcialmente resistente) y Gran enano (AAA) (susceptible). Las mismas fueron aclimatizadas durante un período de 45 días en cajas de polietilurano y posteriormente fueron transplantadas en macetas de 20 cm de altura y 20 cm de diámetro. El sustrato empleado estuvo compuesto por un 50% de humus de lombriz, 30% de compost y un 20% de vermiculita. Se aplicó un riego mediante microaspersores colocados sobre la superficie del soporte empleado para ubicar las plantas en invernadero. El período de riego se programó mediante un cronómetro de ajuste manual, con cinco minutos de duración e intervalos de 30 minutos. Se utilizó una fuente de iluminación artificial con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una intensidad aproximada de $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. A los cuatro meses de edad fueron seleccionadas plantas que tenían un tamaño promedio de 30 cm de altura y un total de cinco hojas activas. Tres días antes de la inyección con juglone, las plantas fueron trasladadas a una cámara con humedad saturante para lograr una adecuada apertura estomática de las hojas y así minimizar los daños mecánicos.

Inyección del juglone sobre cultivares de *Musa* spp.

Se utilizó el juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone, Sigma, Co). Se empleó una solución de metanol al 10% como control así como para disolver homogéneamente esta toxina. Se utilizaron

concentraciones de 10, 25, 50, y 100 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Se usaron cinco plantas tanto para el control como para los tratamientos. La inyección de las hojas se realizó según la técnica descrita por Molina (1989). En cada inyección se utilizó un volumen aproximado de 0.1 ml. En las dos últimas hojas expandidas, se inyectaron 20 puntos por cada una.

Evaluaciones

Se evaluó la variable promedio del porcentaje de necrosis foliar por plantas a las 24h después de la inyección, mediante la fórmula siguiente: % necrosis = $100 \times n/N$, donde n representa el total de puntos por plantas y N corresponde al total de puntos inyectados.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente aleatorizado. Se utilizó el paquete estadístico SPSS\SS versión 9.0 para Windows. Para la comparación de las medias de los tratamientos con las diferentes dosis empleadas, se utilizó la prueba t-student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

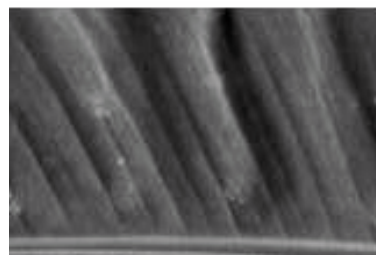
Mediante la inyección de juglone sobre la superficie abaxial de las hojas, se lograron obtener síntomas de necrosis foliar en ambos cultivares de bananos. Los mismos aparecieron con mayor rapidez e intensidad sobre el cultivar Gran enano.

Al utilizar varias concentraciones de juglone se obtuvieron diferencias entre los cultivares empleados. La concentración de 50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ fue la única que permitió establecer diferencias claras entre el cultivar Gran enano y el Fougamou (Tabla 1 y Fig. 1).

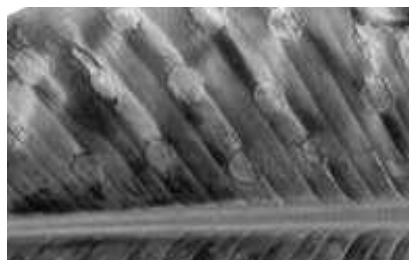
Tabla 1. Porcentaje de necrosis foliar en cultivares de bananos inyectados con diferentes concentraciones de juglone a las 24 horas.

Cultivares	Evaluaciones a las 24 horas			
	10 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	25 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	100 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$
Gran enano (AAA)	4.8 a	5 a	90 a	100 a
Fougamou (ABB)	0 a	0 a	0 b	100 a

Medias con letras iguales en el sentido de las columnas, no difieren estadísticamente para $P < 0.05$ según la prueba t-student



B



A

Figura 1. Necrosis foliar en la superficie adaxial de hojas inyectadas con la concentración de 50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de juglone en dos cultivares de *Musa* spp. a las 24 horas. A- Fragmento de Hoja del cultivar Fougamou. B- Fragmento de Hoja del cultivar Gran enano

Las plantas inyectadas con metanol al 10% no presentaron síntomas de necrosis foliar lo que demostró que este solvente orgánico puede utilizarse como control en estudios futuros acerca de la actividad biológica de esta toxina.

Se pudo comprobar la posibilidad de obtener una concentración adecuada de juglone para diferenciar genotipos de *Musa* spp. con diferentes niveles de resistencia frente a *M. fijiensis*. En este sentido, Hernández (1995), al realizar la evaluación de la actividad biológica del extracto crudo a partir del filtrado de cultivo de *M. fijiensis*, logró establecer una concentración que le permitió diferenciar los cultivares de *Musa* spp. Acerca de los metabolitos fitotóxicos producidos por *M. fijiensis* se han desarrollado ensayos con el objetivo de estudiar la actividad biológica de los mismos. Sin embargo son pocos los autores que han empleado el juglone para tales fines (Cutsem, 1999; Jack, 2000). Algunos han empleado extractos semipurificados y filtrados de cultivo para la evaluar la actividad biológica de los mismos. Pino *et al.* (1996), emplearon este procedimiento en la selección temprana de bananos y plátanos resistentes a *M. fijiensis*. Harelimana *et al.* (1997) mediante el empleo de fitotoxinas de *M. fijiensis* lograron evaluar el comportamiento de diferentes cultivares de *Musa* spp. con diferentes niveles de resistencia frente a *M. fijiensis*.

La importancia de determinar la concentración adecuada del agente selectivo para lograr una respuesta que permita establecer diferencias precisas entre los genotipos estudiados, ha sido señalada por diversos autores en diferentes patosistemas. Abbas *et al.* (1995), estudiaron diferentes dosis de análogos sintéticos de las toxinas de *Alternaria alternata* y de las toxinas producidas por *Fusarium moniliforme* (fumonisin B) sobre diferentes hospederos. De igual manera, Evidente *et al.* (1998), lograron con la dosis de 30 µg de ascaulitoxin, la inducción de manchas con bordes cloróticos sobre la superficie foliar del apazote blanco (*Chenopodium album*). Dyan *et al.* (1999), al comparar la fototoxicidad de la toxina artemisia sobre diferentes especies (*Lolium*, *Lactuca* y *Arabidopsis*), determinaron que la mayor actividad biológica se alcanzó con la concentración de 1 g.l⁻¹.

El presente resultado, constituye una etapa importante en los estudios acerca del efecto de las toxinas de *M. fijiensis* sobre diferentes cultivares de bananos, que posibilitarían la selección temprana de genotipos promisorios, obtenidos en los programas

de mejoramiento genético de *Musa* spp. que actualmente se desarrollan.

REFERENCIAS

- Abbas, KH, Tanaka, T, Shier, T (1995) Biological activities of synthetic analogues of *Alternaria alternata* A toxin (AAL-toxin) and fumonisin in Plant and mammalian cell cultures. *Phytochemistry* 40:1681-1689
- Cutsem (1999) Etude de l'effet de substances toxiques produites par *Mycosphaerella fijiensis* agent causal de la cercosporiose, sur le fonctionnement de chloroplastes de bananier. <http://www.fundp.ac.be/recherche/thematiques/fr/214.html> consultada online el 12-12-01
- Dyan, EF, Hernández, A, Allen, NS, Moraes, MR, Vroman, AJ, Avery, AM, Duke, OS (1999) Comparative phytotoxicity of artemisin and several sesquiterpene analogues. *Phytochemistry* 50: 607-614
- Evidente, A, Caposso, R, Cutignano, A, Tagliatela-Scafati, O, Vurro, M, Zonno, MC, Motta, A (1988) Ascaulitoxin, a phytotoxic Bis-amino acid N-glucoside from *Ascochyta caulina*. *Phytochemistry* 48: 1131-1137
- Harelimana, Lepoivre, P, Jijalkli, H, Mourichon, X (1997) Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black Leaf Streak. *Euphytica* 96: 125-128
- Hernández, NR (1995) Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa* spp. para la evaluación de su respuesta a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet). Tesis para optar por el título académico de Magister Scientiae. Centro agronómico tropical de la investigación y la enseñanza. Turrialba, Costa Rica
- Molina, G, Krausz, J. (1989) Phytotoxic activity on crude extract from *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis* and its use for evaluating resistance levels to Black Sigatoka. *Plant Diseases*. 73: 142-144
- Mourichon, X, Lepoivre, P, Carlier, J (2000) Host pathogen interaction. Chapter 2. Fungal disease of the foliage. Pp 67-72 in *Diseases of banana, abaca, and enset* (D.R. Jones, ed) CAB international
- Okole, BN, Schulz y FA (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*-resistant cell lines from micro-cross section of banana and plantain. *Plant cell report* 16: 339-343
- Pino, AJ, Navarro, W, Salazar, R, Valerin, A (1996) Selección temprana de bananos y plátanos resistentes a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet mediante fitotoxinas. *Biología Aplicada* 13: 132p.
- Stierle, A, Upadhyay, R, Hershenhorn, J, Strobel, G, Molina, G (1991) The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease of banana and plantains. *Experientia* 47:853-859
- Upadhyay, R, Strobel, GA, Coval, S (1990) Some toxins of *Mycosphaerella fijiensis* En: Sigatoka leaf spot diseases of banana and plantain (INIBAP), San José, Costa Rica:pp 225-236