

Efecto de la inyección foliar de juglone sobre el sistema antioxidante de las Superóxido dismutasas en dos cultivares de *Musa* spp.

Michel Leiva Mora^{1*}, Jean Pierre Bussogoro, Philippe Lepoivre. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní 5 ½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: lmichel@ibp.co.cu

RESUMEN

Algunas enfermedades en plantas superiores causan la formación de especies reactivas de oxígeno que actúan como mediadores en la tolerancia al estrés oxidativo. Varias toxinas microbianas son capaces de inducir su formación a través de diferentes mecanismos que dañan las células vegetales. En el presente trabajo se determinó el efecto del juglone (toxina producida por *Pseudocercospora fijiensis*) sobre el sistema antioxidante de las Superóxido dismutasas en los cultivares Fougamou (ABB) y Grande naine (AAA) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas. Muestras de proteínas obtenidas a las 2, 4, 6, 8 y 48h después de efectuada la inyección foliar en los cultivares de *Musa* spp, fueron aplicadas en volúmenes de 65 µl equivalente a 120 µg de proteínas totales. Los geles fueron incubados con una solución colorante (25 mg.ml⁻¹ de azul tetrazolium (NTB) y 0.1 mg.ml⁻¹ de riboflavina) y fueron expuestos a la luz. En ambos genotipos se observaron cambios en la expresión de este sistema isoenzimático antioxidante respecto a los controles. En el cultivar Grande naine (AAA) a partir de las 4 h desapareció una isoforma presente en el control, mientras que en el Fougamou (ABB) a partir de las 2 h se observó una nueva isoforma la cual se mantuvo hasta las 48 h después de la inyección. Este resultado mostró una correspondencia entre los patrones proteicos de isoformas del sistema de las superóxido dismutasas y la tolerancia al estrés oxidativo causado por el juglone en cultivares de *Musa* spp.

Palabras clave: enzimas antioxidantes, estrés oxidativo, *Pseudocercospora fijiensis*, toxinas

ABSTRACT

Some diseases in higher plants cause formation of reactive oxygen species (ROS) which acts like mediator on tolerance to oxidative stress. Several phytotoxins produced by plant pathogen fungus induce ROS by different mechanisms which damage plant cell tissues. This paper was focused to determine juglone impact (*Pseudocercospora fijiensis* toxin) on Superoxide dismutases antioxidant system in Fougamou (ABB) and Grande naine (AAA) by native Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 10%. Samples of proteins were collected at 2, 4, 6, 8 and 48h after juglone injection on both *Musa* cultivar and 65 µl of them (120 µg of total protein) were applied to gels. Gels were incubated in staining solution (25 mg.ml⁻¹ de Nitrobluetetrazolium (NTB) and 0.1 mg.ml⁻¹ de riboflavin) and were exposed to fluorescent light. In both cultivars it was observed changes in expression patterns of superoxide dismutases between injected and not injected plants. On Grande naine (AAA) 4 h after injection an isoform of SOD disappeared respect to control. Nevertheless on Fougamou (ABB), 2 h after injection it was activated a new isoform which was observed until 48 h. In the present work it was observed a correspondence between protein patterns expression of SOD isoforms and tolerance to oxidative stress caused by the effect of juglone on *Musa* spp.

Key words: antioxidant enzymes, *Mycosphaerella fijiensis*, oxidative stress, toxins

INTRODUCCIÓN

Una de las principales paradojas de la vida en nuestro planeta lo constituye la molécula de oxígeno, la cual asegura la vida de los organismos aeróbicos, sin embargo, no es solamente importante para los procesos del metabolismo energético y la respiración, sino que está relacionada con muchas enfermedades y condiciones degenerativas (Marx, 1985). Así, durante el desarrollo de algunos procesos metabólicos en el interior celular de los organismos aerobios, se produce la activación de varios estados reactivos de la molécula de oxígeno (radicales libres), que causan un estrés oxidativo y conducen a desórdenes fisiológicos en plantas superiores, debido a la formación de las especies reactivas de oxígeno

(Scandalios, 1993; Goodman, 1994; Bolwell y Wojtaszek, 1997).

Afortunadamente las células vegetales cuentan con complejos sistemas antioxidantes, que han surgido para proteger a las células de los daños de las membranas y organelos celulares, sujetos a condiciones oxidativas. Estos sistemas se dividen en tres grupos: (1) reductores liposolubles y tocoferoles asociados a membranas, (2) reductores hidrosolubles tales como el ácido ascórbico y el glutatión, y (3) enzimas antioxidantes como: superóxido dismutasas (SOD), catalasas, peroxidasas, glutatión reductasas y ascorbato peroxidasas. Las superóxido dismutasas, son metaloproteínas que son capaces de catalizar la

reacción de dismutación del anión superóxido para convertirlo en peróxido de hidrógeno y agua, productos mucho menos reactivos y tóxicos para la célula (Monk *et al.*, 1989; Alscher *et al.*, 2002). Se sabe que este sistema está presente en las células de los organismos aeróbicos, así como en aquellos compartimentos celulares que se relacionan con las especies reactivas de oxígeno (Beyer, *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1992; Scandalias, 1993). Existen varias isoformas que se clasifican según el cofactor metálico que esté presente (Cu-SOD, Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD), así como en su distribución celular (Bowler *et al.*, 1992).

Varias bacterias y hongos fitopatógenos, a través de la producción y difusión de toxinas en el interior de los tejidos afectados, provocan daños celulares que se relacionan con el estrés oxidativo. El juglone (5-hidroxi-1,4-naftohidroquinona), es un representante de un grupo de compuestos secundarios ampliamente conocidos por sus efectos tóxicos. Los principales daños a nivel celular y bioquímico, comprenden: ruptura de la cadena del ADN, peroxidación de los lípidos presentes en las membranas celulares, degradación de proteínas, pigmentos u otras moléculas y la disminución en capacidad antioxidante de algunos sistemas protectores.

Los síntomas causados por *Mycosphaerella fijiensis*, el agente causal de la Sigatoka negra en *Musa spp*, se caracterizan por lesiones pronunciadas con la presencia de halos cloróticos, lo cual sugiere la liberación de toxinas por parte del patógeno (Molina y Krausz, 1989; Carlier *et al.*, 2000). El mecanismo de acción de esta toxina aun no ha sido completamente estudiado, a pesar de haberse comprobado que los cloroplastos constituyen el sitio de acción primaria de la misma (Harelimana *et al.*, 1997). El juglone, además, causa la oxidación de importantes antioxidantes naturales como el ascorbato, compuesto abundante en los tejidos vegetales (Busogoro *et al.*, 2004).

A pesar que muchas de las especies reactivas de oxígeno son producidas en diferentes organelos celulares, aun no se conoce el papel que desempeñan algunos sistemas antioxidantes en la tolerancia al estrés oxidativo, causado por la presencia de toxinas producidas durante el proceso de colonización de diversos hongos fitopatógenos. Por ello el presente trabajo tuvo como objetivo principal, evaluar el efecto del juglone sobre el sistema antioxidante de las superóxido dismutasas en dos cultivares de *Musa spp*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas procedentes del cultivo *in vitro* de los cultivares: Grande naine (AAA) susceptible y

Fougamou (ABB) parcialmente susceptible. Las mismas fueron aclimatizadas en macetas de dos litros de capacidad. Como sustrato se empleó una mezcla de 30 % de compost y 70% de vermiculita. Se aplicaron riegos de 5 min de duración a intervalos de 30 min, mediante aspersión, la frecuencia de riego se controló con un cronómetro. Se empleó una fuente de iluminación artificial con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. A los cuatro meses de edad fueron seleccionadas plantas con un tamaño de 30-40 cm de altura y al menos cinco hojas fisiológicamente activas. Las mismas fueron trasladadas a una cámara de polietileno con humedad saturante para lograr una adecuada apertura estomática de las hojas y así minimizar los daños mecánicos en las hojas inyectadas.

Inyección foliar del juglone sobre cultivares de *Musa spp*.

Se utilizó el juglone (Sigma, Co) y una solución de metanol al 10% como control así como para disolver homogéneamente esta toxina. Fue empleada una concentración de 50 mg.l⁻¹ de juglone y 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 en el envés.

Extracción de las proteínas totales

Las proteínas totales fueron extraídas a partir de muestras de tejido vegetal maceradas y conservadas a -80°C. En tubos de 2 ml de capacidad, se añadieron 0.5 g por tubo y se utilizó un total de tres réplicas por cada muestra. A cada uno se le adicionaron 0.5 ml de la solución tampón fosfato de potasio 50 mM pH 7.6, metabisulfito de sodio 10 mM, ácido ascórbico 1mM, EDTA 1mM, sorbitol 20% (p/v), polivinilpolipirrolidona 2% (p/v). Los tubos fueron centrifugados durante 20 min a 10 000 g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos preenfriados en nitrógeno líquido y estos fueron sometidos a centrifugación durante 20 min a 10 000 g a 4°C. Finalmente los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos preenfriados que se conservaron a -80°C. Para la cuantificación de la concentración de las proteínas totales en cada muestra se empleó la técnica descrita por Bradford (1976), mediante la utilización de seroalbúmina bovina como estándar de calibración.

Electroforesis y revelación de las Superóxido Dismutasas Totales (SOD_t)

La electroforesis se realizó en condiciones nativas para cada muestra de proteína. Las mismas fueron aplicadas a mini geles de poliacrilamida al 10%. En los pocillos del gel, se aplicaron 65 µl de las muestras obtenidas a las 2, 4, 6, 8, 48h después de efectuada

la inyección foliar, que equivalían a 120 µg de proteínas totales. La migración electroforética, se desarrolló durante 45 min a 4°C, 175 V y máximo amperaje.

Los patrones de las SOD_t fueron revelados según el método propuesto por Beauchamp y Fridovich (1971). Finalmente los geles fueron incubados con una solución colorante 25 mg.ml⁻¹ de azul tetrazolium (NTB) y 0.1 mg.ml⁻¹ de riboflavina. Las diferentes

isoformas se visualizaron como bandas acromáticas en un fondo rojo púrpúreo, después de exponer durante 10 min el gel a una fuente de luz blanca fluorescente de 60 mol.m⁻²s⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inyección de juglone provocó cambios en los niveles de expresión del sistema enzimático antioxidante de las SOD_t en ambos cultivares de bananos, en comparación con los controles (Figura 1).

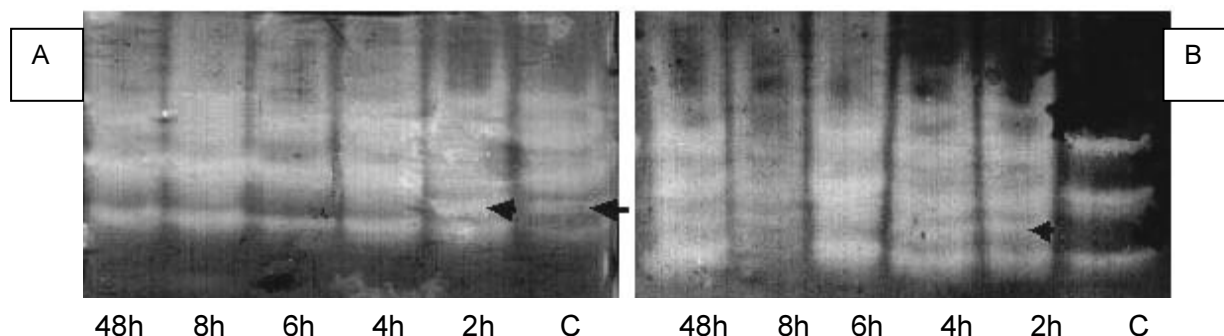


Figura 1. Patrón de las SOD_t obtenidas a partir de plantas de los cultivares Grande naine (AAA) y Fougamou (ABB), inyectadas con juglone (50 ppm). De derecha a izquierda, cada carril corresponde a la revelación de las SOD_t de los tratamientos estudiados (C: proteínas extraídas de hojas sin inyectar) así como hojas inyectadas y cosechadas a las 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 48 h después de haber realizado la inyección del juglone. Las flechas en el panel de la izquierda, indican una banda presente en el control y a las 2 h después de la inyección, la cual desaparece en el resto de los tratamientos. La flecha en el panel de la derecha, indica una nueva banda ausente en el control, la cual se mantiene en el resto de los tratamientos.

En el cultivar Grande naine (AAA), apareció una banda de SOD_t, presente en el control así como en el tratamiento 2h después de la inyección, la cual no se observó en el resto de los tratamientos (4, 6, 8, 24 y 48 h). Este resultado indicó la inhibición temprana, de una isoforma de las SOD_t después de la inyección de la toxina en los tejidos de este cultivar. Ello puede significar, que la ausencia de determinadas isoformas de este patrón isoenzimático conduzca a la pérdida de la facultad de la célula vegetal de detoxificar especies reactivas de oxígeno, en particular el anión superóxido (O⁻²), inducidas por la liberación de toxinas en los espacios intercelulares de las hojas inyectadas. Esta incapacidad en los sistemas detoxificadores de radicales libres letales, implican un desequilibrio redox interno en las células vegetales y con ello la muerte celular (Bowler *et al.*, 1992).

Por otra parte, los extractos proteínicos obtenidos del cultivar Fougamou (ABB), mostraron un patrón diferente de las SOD_t (Figura 1). A partir de las 2 h después de la inyección de juglone se observó un efecto estimulante en los niveles de expresión del sistema enzimático antioxidante de las SOD_t, contrariamente a lo observado en el cultivar Grande naine (AAA). A las dos horas después de realizada la inyección, apareció una nueva banda la cual se mantuvo incluso hasta las 48 h. Esto significa que la inyección de la toxina, produjo una activación

en el sistema de las SOD_t al observarse una nueva isoforma. El cultivar Fougamou (ABB) fue capaz de activar el SOD debido al estrés oxidativo provocado por el juglone lo que debe conducir a la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno y con ello el equilibrio redox del interior celular. La respuesta en fases tempranas frente al estallido oxidativo, evitó la muerte celular así como la aparición de necrosis foliar. El análisis de este sistema antioxidante, coincidió con los estudios desarrollados por varios investigadores, quienes han considerado a las SOD_t como el factor principal en la defensa celular contra el estrés oxidativo (Beyer *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1992; Scandalias, 1993). En este sentido Tanaka *et al.* (1999), emplearon plantas transgénicas de arroz para evaluar la tolerancia a condiciones salinas, mediante la detección de las SOD_t totales, donde detectaron niveles superiores de expresión en las plantas transformadas. Sin embargo, Ajit (1999), detectó en plantas transgénicas de *Solanum tuberosum*, una sobre expresión en los niveles de las SOD frente a la acción de la radiación ultravioleta y el ataque de patógenos. Por otra parte Lynch y Kuramitsu (2000), consideraron el sistema antioxidante de las SOD_t como el mecanismo principal que emplean muchas bacterias patógenas en animales y humanos para superar las reacciones oxidativas defensivas que se activan durante la reacción inmune.

Las SODt de igual modo, están involucradas en la respuesta frente a factores abióticos. Lee *et al.* (2000), al examinar hojas de pepino (*Cucumis sativus* L), sometidas a un estrés, causado por bajas temperaturas, concluyeron que en dichas condiciones se activaron los sistemas antioxidantes de las superóxido dismutasas (SODt), Ascorbato peroxidasa (APx) y la Glutación reductasa (GR). Resultados similares fueron obtenidos por Martínez *et al.* (2001), quienes basados en el estudio de este sistema antioxidante (SOD), lograron evaluar la resistencia a la congelación de varios genotipos de *Solanum* spp, sujetos a condiciones oxidativas causadas por estrés hídrico.

El presente estudio relacionó el sistema antioxidante de las SODt con los fenotipos de la respuesta de dos cultivares de *Musa* spp frente a *Mycosphaerella fijiensis*, así como los niveles de expresión en el tiempo de este sistema antioxidante para garantizar la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno producidas después de la inyección del juglone.

Se conoce que todas las isoformas de las SODt son codificadas nuclearmente y que son dirigidas hacia cada compartimento celular por secuencias aminotermiales (Tsang *et al.*, 1991). En algunos trabajos se han clonado isoformas en diferentes especies de plantas, con el objetivo de realizar estudios acerca del papel de los sistemas antioxidantes en la respuesta de defensa a patógenos (Bowler *et al.*, 1992; Scandalias 1993). Si se toma en consideración lo anterior, sería razonable determinar la distribución de las diferentes isoformas de las SOD en los principales compartimentos subcelulares así como determinar su papel en el mantenimiento del equilibrio redox del interior celular. Con ello se sentarían las bases para estudios futuros de transformación genética, como una estrategia alternativa para reforzar los mecanismos naturales defensivos en *Musa* spp frente a las toxinas del patógeno.

REFERENCIAS

Ajit, SK (1999) Responses of transgenic plants overexpressing antioxidant enzymes to ozone and pathogens PhD Thesis, Rutgers University, New Brunswick

Beauchamp, C y Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assay applicable to acrylamide gels. *Ann. Biochem.* 44: 276-287

Beyer, W, Imlay J y Fridovich I (1991) Superoxide dismutases. *Prog Nucl. Acid Res.* 40: 221-53

Bolwell, GP y Wojtaszek P (1997) Mechanisms for generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 347-366

Bowler, C, Slooten, L, Van Montagu I e Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Biol.* 43: 83-116

Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 24-254

Busogoro, JP, Etamé JJ, Lognay G, Messiaen J, Van Cutsem P, Lepoivre P (2004) Analysis of the mechanisms of action of *Mycosphaerella fijiensis* toxins during the development of Black leaf streak disease. En: M Jain y Swennen R (eds) *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, pp. 171-181. Science Publishers. Enfield

Carlier, J, Fouré E, Gauhl F, Jones D, Lepoivre P, Mourichon X, Pasberg-Gauhl C y Romero (2000) Black leaf streak. En: Jones DR (Ed.) *Disease of Banana, Abacá and Enset*, pp. 37-79. CABI. Wallingford.

Carlier, J, Fonsi E, Gauhl F, Jones S, Lepoivre P, Maurichon X, Pasberg Gauhl C, Romero R (2000) Black leaf streak. En: Jones DR (Ed.) *Disease of Banana, Abacá and Enset*, pp. 37-79. CABI. Wallingford

Goodman, BA (1994) The involvement of oxygen derived free radicals in plant-pathogen interactions. *Proc. Royal Soc. Edinb.* 102B: 479-493

Harelimana, G, Lepoivre P, Jijakli H y Mourichon X (1997) Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black Leaf Streak. *Euphytica* 96: 125-128

Lee, HD y Lee BC (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant science* 159: 75-85

Lynch, M y Kuramitsu T (2000) Expression and role of superoxide dismutase (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and infection* 2: 1245-1255

Martínez, A C, Loureiro M E, Oliva MA, Maestri M (2001) Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Science* 160: 505-515

Marx, JL (1985) Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 235:529-31

Molina, G y Krausz J (1989) Actividad fitotóxica en extracto de cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis* y su uso para evaluar patrones de resistencia a la Sigatoka negra. *Plant Diseases* 73 (2): 142-144

Monk, LS, Fagerstedt KV y Crawford RMM (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant.* 76: 456-459

Scandalias, J G (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101: 7-12

Tanaka, Y, Hibino T, Hayashi Y, Tanaka A, Kishitani S, Takabe T, Yolota S, Takabe T (1999) Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Science* 148: 131-138