

## Empleo de la tinción anilina azul-KOH en el estudio de la interacción banano-*Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Milady F. Mendoza<sup>1\*</sup>, Elio Jiménez<sup>1</sup>, Frank Maier<sup>2</sup>, Whilhelm Schäfer<sup>2</sup>, Michel Leyva<sup>1</sup>, Mayra Acosta<sup>1</sup> y Yelenys Alvarado<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 51/2, Santa Clara, Villa Clara, CP 54830, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, e-mail: mmendozar@ibp.co.cu

<sup>2</sup>University of Hamburg Center of Applied Molecular Biology of Plants. Institute of General Botany and Botanical Garden, Ohnhorststr. 18, 22609, Hamburg, Germany, e-mail: Schaefer@botanik.uni-hamburg.de

### RESUMEN

El análisis de las primeras etapas del proceso de infección, con el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, fue realizado a partir de la inoculación del mismo en plantas jóvenes de banano obtenidas por cultivo *in vitro*. El sistema experimental hospedante patógeno estudiado incluyó el cultivar 'Niyarma yik' (AA), con susceptibilidad a la enfermedad de la Sigatoka negra y el aislado de *Pseudocercospora fijiensis* CCIBP-Pf1. Para este estudio fue empleada la técnica de tinción fluorescente con anilina azul-KOH. Muestras de hojas infectadas fueron tomadas e incubadas en una solución de hidróxido de potasio, lavadas con agua desionizada, montadas en solución de tinción y observadas con luz ultravioleta. El empleo de esta técnica permitió visualizar con gran resolución y contraste, el crecimiento epifítico del hongo sobre el tejido de la planta en un estadio temprano de la infección.

Palabras clave: hongo, *Musa*, Sigatoka negra

### ABSTRACT

The analysis of the first stages of the infection process with the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet was made beginning with the inoculation of young banana plants obtained from *in vitro* culture. The experimental system host-pathogen studied, included the susceptible cultivar 'Niyarma yik' (AA) to Black Sigatoka disease and the *Pseudocercospora fijiensis* isolate CCIBP-Pf1. The fluorescent staining technique with KOH-aniline blue was used for this study. Samples from infected leaves were taken and incubated in a KOH solution, rinsed in deionized water, mounted in the stain solution and examined with ultraviolet fluorescence. The use of this technique allowed to observe the epiphytic growing of the fungus over the plant tissue with high resolution and contrast, in an early stage of the infection.

Key words: Black Sigatoka, fungi, *Musa*

### INTRODUCCIÓN

El estudio del patosistema banano-*Mycosphaerella fijiensis* (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) resulta de gran interés para los científicos asociados con el tema. Pocos han sido los estudios realizados en esta interacción, por lo que la información existente es limitada (Beveraggi *et al.*, 1995). Aún no han sido claramente definidos los detalles acerca de los eventos de penetración a la planta, toma de nutrientes, colonización del tejido y el conocimiento de los mecanismos utilizados por el patógeno para colonizar *Musa* spp. permanecen sin dilucidar. Esto es debido en parte a la carencia de pruebas moleculares disponibles para caracterizar los factores de patogenicidad, virulencia del hongo y al entendimiento incompleto de las interacciones específicas hospedante-patógeno que ocurren durante el proceso infeccioso (Balint-Kurti *et al.*, 2001).

La profundización en esta relación resulta de gran interés ya que el conocer, entender la genética y organización del genoma podría permitir el desarrollo

de nuevas estrategias, para controlar la enfermedad. Por ello el objetivo del presente trabajo consistió en el empleo de la microscopía de fluorescencia con la tinción de anilina azul-KOH, para visualizar la interacción banano-*Pseudocercospora fijiensis*, en un estadio temprano de la infección.

### MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado en esta investigación fueron plantas de banano del cultivar 'Niyarma yik', procedentes de la propagación *in vitro* según Orellana (1994). Las mismas fueron aclimatizadas por ocho semanas en casas de cultivo hasta que alcanzaron la altura adecuada de 20 cm y cuatro hojas activas, para la realización de la inoculación artificial con una suspensión micelial, según el protocolo descrito por Alvarado *et al.* (2003).

El aislado fúngico de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet utilizado fue el CCIBP-Pf1, perteneciente a la colección de cultivo del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas (UCLV, Cuba).

## Tinción y observación microscópica de las muestras

Fueron tomados varios segmentos de hojas infectadas de 2 x 2 cm de una misma planta, a los 5 días posteriores a la infección. Los mismos se sumergieron en una solución 1 M de Hidróxido de Potasio (KOH) por 30 min a 70 °C, se lavaron tres veces con agua desionizada estéril y se conservaron en el mismo líquido por un período de dos o tres días hasta su utilización.

Para la tinción se tomaron los fragmentos y se introdujeron en un tubo eppendorf que contenía 1.5 ml de la solución de tinción con anilina azul (Hood *et al.*, 1996). La misma fue realizada al vacío por dos horas y posteriormente las muestras fueron montadas en portaobjetos con varias gotas de la solución de tinción y se examinaron por el envés con un microscopio Axioskop (Carl Zeiss, Germany), epifluorescente equipado con el sistema Filter set 02.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tinción con anilina azul-KOH resultó ser simple, adecuada para un mejor entendimiento y documentación de la interacción banano-*Mycosphaerella fijiensis*, en un estadio temprano de la infección. La utilización de la técnica descrita por Hood *et al.* (1996) permitió observar hifas fluorescentes con gran

resolución de las estructuras fúngicas y excelente contraste con el tejido hospedante. La fluorescencia con anilina azul ha sido ampliamente utilizada y resulta muy efectiva en la tinción de hongos. A ella se le atribuyen muchas ventajas dada la simplicidad de la técnica, la rapidez y la disponibilidad de reactivos. Frecuentemente otros protocolos describen la incubación con múltiples reactivos y requieren de mayor tiempo para completar el proceso (Bougourd *et al.*, 2000).

Fue posible observar el crecimiento epifítico del hongo y la penetración de hifas a través de los estomas con gran calidad y transparencia del tejido (Figura 1). Uno de los problemas comúnmente encontrados con los colorantes fluorescentes, en la investigación de las interacciones planta-hongo, es la autofluorescencia del tejido de la planta y la unión no específica del fluorocromo. Es por ello que la permanencia en agua del tejido contribuyó a disminuir el fondo que normalmente se obtiene.

La utilización de esta tinción permitió visualizar los eventos que ocurren en el sistema banano-*M. fijiensis*, en la etapa inicial de la infección, así como observar la evolución de las microlesiones y la progresión del patógeno (extensión del micelio). Se comprobó que existe un gran crecimiento de micelio epifítico del hongo en la superficie de la hoja en cultivares susceptibles antes del proceso de penetración.

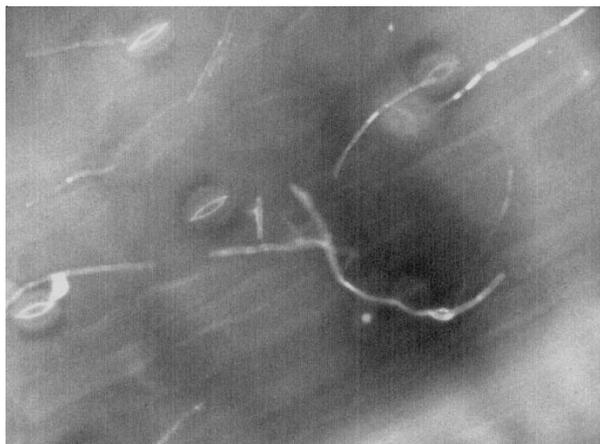


Figura 1. Crecimiento epifítico del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en la superficie de la hoja del cultivar 'Niyarma yik', a los cinco días posteriores a la infección. Se observa también la penetración estomática del patógeno.

## REFERENCIAS

Alvarado, Y, Leiva M, Dita MA, Acosta M, Cruz M, Portal N, Gómez R, García L, Bermúdez I y Padrón Y (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. pp. 169-175. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica. INIBAP

Balint-Kurti, PJ, May GD, Churchill A (2001) Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. FEMS Microbiology Letters 195: 9-15

Beveraggi, A, Mourichon X, Sallé G (1995) Étude comparée des premières étapes de l'infection chez des bananiers

sensibles et résistants infectés par le *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladie des raies noires. Can. J. Bot. 73 : 1328-1337

Bougourd, S, Marrison J, Haseloff J (2000) An aniline blue staining procedure for confocal microscopy and 3D imaging of normal and perturbed cellular phenotypes in mature *Arabidopsis* embryos. The Plant Journal 24 (4): 543-550

Hood, ME, Shew HD (1996) Applications of KOH-Aniline Blue Fluorescence in the study of Plant-Fungal Interactions. Phytopathology 86: 704-708

Orellana, P (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, IBP. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara