

## Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el crecimiento *in vitro* de un aislado cubano de *Mycosphaerella fijiensis*

María I. Oloriz\* y Bárbara Ocaña. Autora para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: maria@ibp.co.cu

### RESUMEN

El rayado negro de la hoja (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) es la principal enfermedad foliar que afecta el cultivo de bananos y plátanos. Uno de los posibles mecanismos de resistencia es la respuesta de tipo hipersensible observada en 'Calcutta 4' (*Musa AA*) que involucra la formación de especies reactivas de oxígeno. Con el objetivo de determinar el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el crecimiento *in vitro* de un aislado cubano de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83, se probaron varias concentraciones adicionadas al medio de cultivo PDB. Transcurridos siete días de incubación se determinó la masa seca del micelio. Se comprobó que con 30 mmol l<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo se estimuló el crecimiento del micelio y con 50 a 100 mmol l<sup>-1</sup> se redujo. Los resultados aportan elementos para la comprensión de las interacciones planta-patógeno en este patosistema.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, rayado negro de la hoja, ROS

## Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the *in vitro* growth of *Mycosphaerella fijiensis* Cuban isolate

### ABSTRACT

Black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) is the main foliar disease of bananas and plantain. One of the possible mechanisms of resistance is the hypersensitive response observed in 'Calcutta 4' (*Musa AA*) that involves the formation of reactive oxygen species. In order to determine the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the *in vitro* growth of *M. fijiensis* Cuban isolate CCIBP-Pf-83, several concentrations added to a culture medium PDB were tested. After seven days of incubation the mycelial dry weight was determined. It was found that with 30 mmol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the culture medium, mycelial growth was stimulated and with 50 up to 100 mmol l<sup>-1</sup> it decreased. The results provide elements for understanding plant-pathogen interactions in this pathosystem.

Key words: black leaf streak disease, *in vitro* culture, ROS

### INTRODUCCIÓN

El Rayado negro de la hoja (Sigatoka negra) es una de las enfermedades de mayor importancia para el cultivo de bananos y plátanos (Carlier *et al.*, 2000). Esta es ocasionada por el hongo hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

El control de la enfermedad resulta difícil (Orozco-Santos *et al.*, 2013). El empleo de cultivares resistentes es la medida de control más efectiva, sin embargo hasta el momento los cultivares de mejor aceptación por la población (bananos con genomas AAA y algunos AAB y plátanos del grupo AAB), resultan susceptibles o con resistencia parcial a *M. fijiensis* (Churchill, 2010).

Algunas de las posibles fuentes de resistencia encontradas en *Musa* a *M. fijiensis* incluyen acumulación de compuestos como fenilfenalenonas, felanonona y perinaftenonas (Otálvaro *et al.*, 2007; Hidalgo *et al.*, 2009), así como se ha descrito una respuesta similar a la respuesta hipersensible (RH) en el cultivar resistente 'Calcutta 4' (*Musa AA*) (Cavalcante *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta que entre los factores involucrados en una RH, se encuentra la acumulación de especies reactivas de oxígeno, es de interés determinar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento *in vitro* de un aislado cubano de *M. fijiensis* (CCIBP-Pf-83).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó el aislado de *M. fijiensis* (CCIBP-Pf-83) perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las plantas (IBP). Este fue obtenido de hojas del cultivar 'Grande naine' (*Musa* AAA), con síntomas característicos de la enfermedad del rayado negro de la hoja. Este aislado ha sido caracterizado sobre la base de su agresividad, caracteres culturales, morfológicos y moleculares (Cruz *et al.*, 2004; Leiva-Mora *et al.*, 2014). El aislado CCIBP-Pf-83 se ha empleado en estudios previos de interacción de *M. fijiensis* con *Musa* spp. cv. 'Grande naine' (AAA) y 'Calcutta 4' (AA) (Portal *et al.*, 2011).

Para determinar el efecto de  $H_2O_2$  sobre el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis* se empleó como inóculo una suspensión micelial de un cultivo crecido en caldo papa dextrosa (PDB) por una semana. De este se tomaron 5.0 g de micelio (masa fresca), se le adicionó medio de cultivo fresco y se preparó una suspensión de micelio con un homogeneizador Ultra Turrax T25 (Rose Scientific Ltd., Canadá) durante 1 min. Con esta suspensión se inocularon Erlenmeyer de 100 ml de capacidad que contenían 50 ml de PDB y diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (0, 30, 50, 75, 85 y 100  $mmol\ l^{-1}$ ). Cada Erlenmeyer contenía aproximadamente 250 mg de micelio. Se utilizaron tres réplicas por tratamiento y el experimento se repitió tres veces.

Los cultivos del hongo se incubaron en agitador orbital a 120 rpm, en la oscuridad y 28°C por una semana. Al cabo del tiempo, se

describieron los caracteres culturales del micelio y se separó por filtración con papel de filtro Whatman 1 (125 mm). Posteriormente, se determinó la masa seca del micelio (g) en cada tratamiento. Para ello, el micelio se secó a 60°C hasta obtener un peso constante (aproximadamente 40 h).

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el programa SPSS Statistics versión 18.00. Previa comprobación del no cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se emplearon las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney para la comparación de las medias entre tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del experimento demostraron que el  $H_2O_2$  influyó en el crecimiento *in vitro* del aislado cubano *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83. Se observaron cambios en la coloración del micelio a partir de 75  $mmol\ l^{-1}$ , con pérdida de la pigmentación (Figura 1).

Los resultados de las determinaciones de la masa seca del micelio, mostraron variaciones en el crecimiento del micelio en medio de cultivo PDB con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (Figura 2). Al adicionar 30  $mmol\ l^{-1}$  de  $H_2O_2$  se incrementó significativamente el crecimiento. Sin embargo, a partir de 50  $mmol\ l^{-1}$ , se produjo una reducción significativa, que para esta concentración fue de un 35.42%. El sucesivo incremento de las concentraciones de  $H_2O_2$ , redujo aún más el crecimiento de *M. fijiensis*.

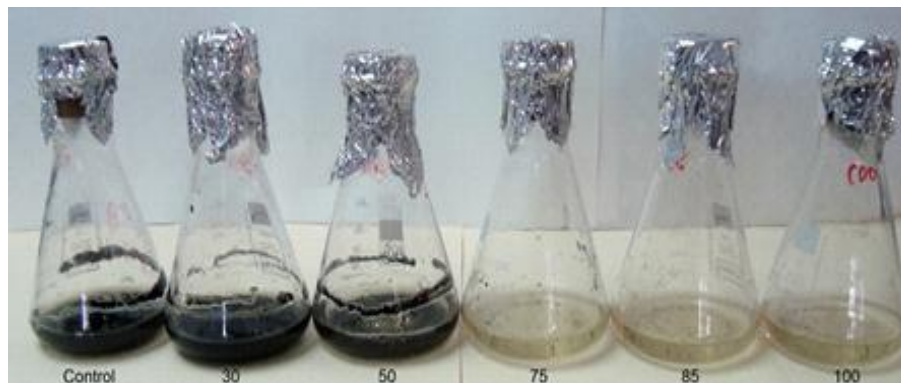


Figura 1. Cultivo de *M. fijiensis* crecido por una semana en medio de cultivo líquido PDB con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  añadido al medio. Los números indican las concentraciones de 30, 50, 75, 85, 100  $mmol\ l^{-1}$  de  $H_2O_2$ .

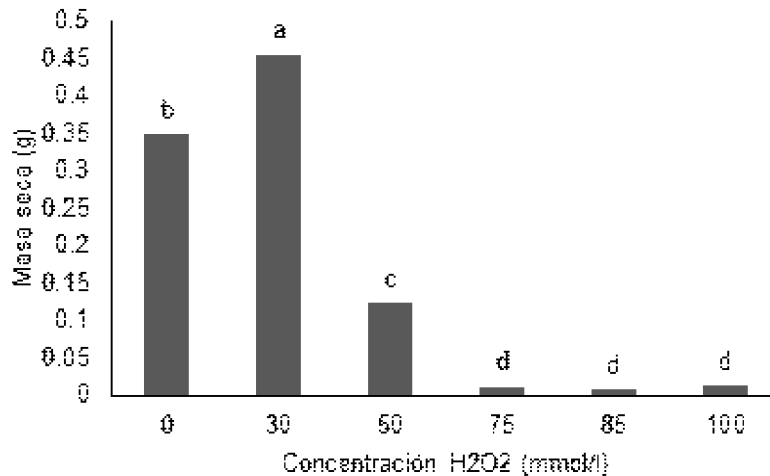


Figura 2. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis*. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas entre las medias según la prueba de Kruskal Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0.05$ .

Estudios realizados en varias especies de hongos fitopatógenos, han mostrado tres respuestas diferentes en cuanto a la capacidad de crecimiento del micelio frente a concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-3</sup> M, incluidas las especies que contienen melanina *Alternaria alternata* y *Cladosporium cladosporioides*. Los tipos de respuesta fueron: 1) crecimiento constante entre 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-4</sup> M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y decrece el crecimiento a partir de 10<sup>-3</sup> M; 2) decrecimiento constate cuando se incrementan las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 3) incremento del crecimiento del micelio en concentraciones entre 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-5</sup> M (Ivanova *et al.*, 2005). Estas respuestas no fueron observadas de igual forma en este experimento a las concentraciones empleadas (10<sup>-2</sup>M).

Para el caso del aislado CCIBP-Pf-83 la presencia de 30 mmol l<sup>-1</sup> (3.10<sup>-2</sup>M) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representó un estímulo para el crecimiento en las condiciones del experimento, contrastando con la reducción del crecimiento observado a partir de 50 mmol l<sup>-1</sup> (5.10<sup>-2</sup>M). Aunque no se tienen referencias exactas de las concentraciones de peróxido que se producen en cultivares de banano resistentes y susceptibles a *M. fijiensis* durante la interacción, sí es conocido que la respuesta del cultivar resistente 'Calcutta 4' genera especies reactivas de oxígeno anticipadamente y en mayor magnitud con respecto al cultivar susceptible 'Grande naine' (Sánchez-García *et al.*, 2010; Mendoza, 2013). Los resultados de

este experimento *in vitro*, salvando las diferencias con las condiciones *in vivo*, dan una idea de la necesidad de generar por la planta concentraciones iguales o superiores a los 50 mmol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tejido foliar en contacto con el hongo, para limitar su crecimiento durante el proceso de colonización. Por otro lado, aquellos cultivares que generen concentraciones iguales o próximas a los 30 mmol l<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pudieran tener consecuencias peores en el desarrollo de la enfermedad porque podrían estimular el crecimiento.

Comparando los resultados con un estudio similar de un aislado mexicano de *M. fijiensis* realizado por Beltrán-García *et al.* (2009), el aislado cubano CCIBP-Pf-83 sufre una mayor reducción del crecimiento a partir de la concentración de 50 mmol l<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Según Beltrán-García *et al.* (2009), el aislado empleado provenía de un campo de banana donde los fungicidas son extensivamente usados, desarrollando un mecanismo de adaptación que le permite mayor resistencia a los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contrariamente, CCIBP-Pf-83 fue aislado de una pequeña parcela, donde no se aplican fungicidas, aunque en Cuba las aplicaciones de fungicidas para la Sigatoka negra, son consideradas bajas.

Este estudio permitió determinar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento *in vitro* de un aislado cubano de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 y contribuye a brindar un análisis

más integrador de los resultados obtenidos en los estudios de la interacción con *Musa* donde se ha utilizado. Sin lugar a dudas, abre nuevas interrogantes para un fenómeno tan complejo como la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*.

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del laboratorio de Microbiología aplicada del IBP que amablemente ofrecieron el aislado (CCIBP-Pf-83) de *M. fijiensis*.

## REFERENCIAS

- Beltrán-García MJ, Manzo-Sanchez G, Guzmán-González S, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola M, Avila-Miranda M, Ogura T (2009) Oxidative stress response of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease in banana plants, to hydrogen peroxide and paraquat. *Can J Microbiol* 55: 887–894
- Carlier J, Fouré E, Gauhl F, Jones DR, Lepoivre P, Mourichon X, Pasberg-Gauhl C, Romero, RA (2000) Black leaf streak. En: DR Jones (Ed.) *Diseases of Banana*, Abacá and Enset, pp. 37–79. CABI Publishing. New York
- Cavalcante MdJB, Escoute J, Madeira JP, Romero RE, Nicole MR, Oliveira LC, Hamelin C, Lartaud M, Verdeil J L (2011) Reactive oxygen species and cellular interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and banana. *Tropical Plant Biology* 4: 134-143
- Churchill ACL (2010) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Mol Plant Pathol* 12: 307-328
- Hidalgo W, Duque L, Saez J, Arango R, Gil J, Rojano B, Schneider B, Otálvaro F (2009) Structure-activity relationship in the interaction of substituted perinaphthenones with *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7417-7421
- Ivanova AE, Aslanidi KB, Karpenko IuV, Belozerskaia TA (2005) The effect of hydrogen peroxide on the growth of microscopic mycelial fungi isolated from habitats with different levels of radioactive contamination. *Mikrobiologija* 74:756-65
- Mendoza MF (2013) Caracterización molecular de la interacción *Musa acuminata*- *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Tesis de Doctorado. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Santa Clara
- Orozco-Santos M, García-Mariscal K, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Martínez-Bolaños L, Garrido-Ramírez E, Torres-Amezcu JA, Canto-Canché B (2013) La sigatoka negra y su manejo integrado en banano. Libro Técnico Núm. 1. Campo Experimental Tecomán, CIRPAC, INIFAP. Tecomán, Colima
- Otálvaro F, Nanclares J, Vásquez L E, Quiñones W, Echeverri F, Arango R, Schneider B (2007) Phenalenone-type compounds from *Musa acuminata* var. 'Yangambi km 5' (AAA) and their activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Natural Products* 70: 887-890
- Portal O, Izquierdo Y, De Vleeschauwer D, Sánchez-Rodríguez A, Mendoza-Rodríguez M, Acosta-Suárez M, Bárbara O, Jiménez E, Höfte M (2011) Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*-banana interaction. *Plant Cell Rep.* 30: 913-918
- Sánchez-García C, Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Acosta-Suárez M, Leiva-Mora M, Roque B (2010) Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal* 2 (2): 89-97
- Torres J M, Calderón H, Rodríguez-Arango E, Morales J G, Arango R (2012) Differential induction of pathogenesis-related proteins in banana in response to *Mycosphaerella fijiensis* infection. *European Journal of Plant Pathology* 133: 887-898
- Leiva-Mora M, Portal O, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Rojas L, Roque B, Carrera K (2014) Caracterización molecular de aislados cubanos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en base a grupos de apareamiento sexual. *Rev. Protección Veg* 1:70-74

Recibido: 6-02-2014

Aceptado: 21-03-2014