

## Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MCI) de Higromicina B para su utilización como agente de selección en la transformación de *Mycosphaerella fijiensis*

Mileidy Cruz Martín\*, Mayra Acosta Suárez, Edrey A. Rodríguez, Michel Leiva y Yelenys Alvarado Capó. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5<sup>1</sup>/<sub>2</sub>. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. e-mail: yalvarado@uclv.edu.cu

### RESUMEN

La Sigatoka negra puede considerarse desde el punto de vista económico la enfermedad más seria para el género *Musa*. En la actualidad el uso de nuevas técnicas biotecnológicas aplicadas al estudio de la interacción hospedero-patógeno se vislumbra como una herramienta importante en el futuro mejoramiento de los cultivares comerciales de bananos y plátanos. En este trabajo se probaron diferentes concentraciones de Higromicina B frente a *Mycosphaerella fijiensis* (aislado CCIBP-1) mediante el método de dilución en agar. Se comprobó que la Higromicina B logró inhibir el crecimiento de *M. fijiensis* a partir de 0.5 mg.l<sup>-1</sup>, este valor se tomó como su MCI, por tanto, puede ser usada como agente de selección en estudios de transformación genética del patógeno. Además, se demostró la validez del protocolo empleado que permitirá la evaluación de este u otros patógenos fungosos frente a sustancias antimicrobianas de interés.

Palabras clave: antibiótico, fitopatógeno, Sigatoka negra

### ABSTRACT

The Black sigatoka can be considered from the economic point of view the most serious disease in the gender *Musa*. At present the use of new biotechnological techniques applied to the study of the host-pathogen interaction is glimpsed as an important tool in the future improvement of the commercial cultivars of the banana and plantain. In this study, we tested different concentrations of Hygromycin B against an isolate of *M. fijiensis* (CCIBP-1) by the agar dilution method. It was proved that Hygromycin B was able to inhibit the growth of the *M. fijiensis* starting from 0.5 mg.l<sup>-1</sup>. This value was taken as the minimum inhibitory concentration, that's why it could be used like selective agent in the transformation studies of *Mycosphaerella* complex. By another hands it was demonstrated the value of the previous protocol of the Minimum Inhibitory concentration for making evaluations of different fungus pathogens against antimicrobial substance.

Key words: antibiotic, Black sigatoka, phytopathogen

La Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, puede considerarse desde el punto de vista económico la enfermedad más seria para el género *Musa* (Pérez, 1996). En la actualidad su control se realiza fundamentalmente a través de aspersiones con productos químicos con acción fungicida. Sin embargo, la necesidad de buscar nuevas vías se hace cada día más inminente debido a que el hongo va adquiriendo resistencia a muchos de estos productos, sin considerar, además, las implicaciones ecológicas y toxicológicas del uso de los mismos sobre el medio ambiente y el propio hombre. Por estas razones es que en la actualidad se han creado un grupo de posibles alternativas que se vislumbran como herramientas importantes en el futuro mejoramiento de los cultivares del género *Musa* (Robinson, 1996 y Dadzie, 1998). Entre ellas se destacan nuevas técnicas como la biología molecular y la transformación genética de plantas.

Debido a la escasez de conocimientos sobre la interacción *M. fijiensis* –*Musa* se requiere de

estudios que involucren la transformación genética del patógeno como herramienta con perspectivas para la caracterización de los factores de patogenicidad y virulencia de este hongo (Balint-Kurti *et al.*, 2001). Este método permite ampliar el conocimiento sobre la especificidad de la interacción hospedero-patógeno y un mejor entendimiento de los mecanismos de resistencia (Payne *et al.*, 1998).

La disponibilidad de un procedimiento de selección diseñado para eliminar el organismo o tejido no transformado es un componente importante de prácticamente todos los protocolos de transformación. Uno de los métodos más utilizados para la selección de transformantes consiste en exponerlos a compuestos tales como los antibióticos, que inhiben el normal desarrollo de las células del organismo silvestre mientras que los organismos transformados pueden evadir su acción. (Dekeyser, 1990). Para lograr este propósito se precisa conocer la susceptibilidad de los microorganismos en estudio a las sustancias antimicrobianas de que se dispone.

Este trabajo tuvo como objetivo la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de Higromicina B frente a un aislado de *M. fijiensis* (CCIBP-1) para posteriores trabajos de transformación genética del patógeno.

Para la determinación de la MCI de Higromicina B se usó el aislado CCIBP-1 de *M. fijiensis* procedente del cepario del Laboratorio de Fitopatología del IBP el cual fue obtenido de una población del cultivar Gran Enano con síntomas típicos de la enfermedad. Se empleó el método de dilución en agar en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) a partir de modificaciones del protocolo propuesto por Jorgensen *et al.* (1993) para bacterias.

La solución madre del antibiótico se preparó a una concentración de  $5120 \text{ mg.l}^{-1}$  (p/v) en agua bidestilada y desionizada y se esterilizó por filtración con membranas de  $0.22 \mu\text{m}$ . Se utilizaron concentraciones dobles decrecientes desde dos hasta  $0.125 \text{ mg.l}^{-1}$  en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (BioGen).

Las soluciones se prepararon al doble de las concentraciones deseadas y se añadieron al agar fundido ( $48-50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) después de autoclaveado. Se siguió un esquema de dilución que incluyó una dilución final de la concentración del antibiótico en el agar de 1:10.

Las placas de Petri fueron marcadas por el reverso para determinar la orientación de los puntos a inocular, en cada una se colocaron 8 gotas ( $3.5 \mu\text{l}$ , cada una) del inóculo en forma de homogeneizado micelial con una concentración aproximada de  $5 \cdot 10^5 \text{ ufc.ml}^{-1}$ .

Se utilizaron dos placas por cada concentración de Higromicina B y, además, se incluyeron placas con medio de cultivo PDA libres de antibiótico para ser usadas como controles de crecimiento. Posteriormente se dejaron a temperatura ambiente hasta que la humedad de los inóculos fuera absorbida dentro del agar y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  en la oscuridad durante 120h. Se realizaron evaluaciones por observación visual cada 24h para verificar el crecimiento del patógeno, la concentración en la cual se inhibió totalmente fue tomada como la mínima inhibitoria. Además, se midió el diámetro del crecimiento micelial en los puntos de inoculación. Del experimento se realizaron tres repeticiones.

Se comprobó que la Higromicina B logró inhibir el crecimiento de *M. fijiensis* y que, por tanto, este antibiótico puede ser usado como marcador de selección en estudios de transformación genética del patógeno. Además, se demostró la validez del protocolo empleado que permitirá la evaluación de este u otros patógenos fungosos frente a sustancias antimicrobianas de interés.

Durante las primeras 48h no se percibió crecimiento en el control ni en las distintas concentraciones. *M. fijiensis* se ha descrito como un patógeno de lento crecimiento en condiciones *in vitro* (Stover, 1976). Ya a las 120h de incubación se observó crecimiento micelial sobre los puntos de inoculación con las características culturales típicas del aislado. La Higromicina B logró inhibir el crecimiento del aislado CCIBP-1 a partir de  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$ , este valor se tomó como su MCI (Fig. 1).

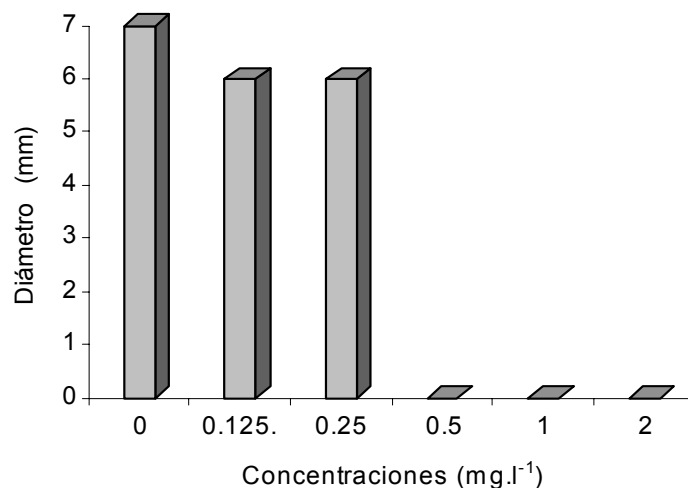


Fig.1 Diámetro del crecimiento del aislado CC IBP-1 de *M. fijiensis* a las 120 h de inoculado en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa en presencia de Higromicina B.

El gen de la higromicinofosfotransferasa (*hpt*) de *Escherichia coli* (Walters *et al.*, 1992; Sági *et al.*, 1995) se ha usado en casos de especies vegetales que no pueden seleccionarse eficientemente con Kanamicina

y en la actualidad se describen métodos de transformación de *Penicillium roqueforti* (Durand *et al.*, 1991), *Mycosphaerella graminicola* (Pnini-Cohen *et al.*, 1996; Payne *et al.*, 1998) y *M. fijiensis* (Balint-

Kurti *et al.*, 2001) en los cuales se ha utilizado Higromicina B para la selección de células transformadas. Otros antibióticos como Bleomicina y Fleomicina también se han empleado en la selección de patógenos fúngicos transformados (Austin *et al.*, 1990).

Balint-Kurti *et al.* (2001) usaron una concentración de 20 mg.l<sup>-1</sup> de Higromicina B en el medio de cultivo para la selección de transformantes de *M. fijiensis*, sin embargo, no mostraron evidencias de la determinación de la MCI del antibiótico frente a ninguna de las tres especies de *Mycosphaerella* estudiadas. El no tomar en cuenta este criterio podría conllevar a resultados erróneos ya que no todos los aislados de un mismo patógeno responden de igual forma frente a un antibiótico determinado. Esto se demuestra en los trabajos de Payne *et al.* (1998) quien utilizó en sus estudios dos aislados de *M. graminicola* con MCI de carbendazim distintas (MCI > 10 mg.l<sup>-1</sup> e igual a 1 mg.l<sup>-1</sup>).

Los resultados de este trabajo permiten complementar los estudios de transformación genética de hongos ya que se reporta por vez primera la MCI de Higromicina B para un aislado de *M. fijiensis* considerando imprescindible la determinación de esta antes de proseguir cualquier estudio donde se utilice un antibiótico como agente de selección. Se demostró, además, la potencia que tiene la Higromicina B como agente de selección de transformantes de *Mycosphaerella fijiensis* dado esto por el valor tan bajo de MCI (0.5 mg.l<sup>-1</sup>) de este antibiótico frente al aislado CCIBP-1.

## REFERENCIAS

Austin, B, Hall, R. M y Tyler, B. M (1990) Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. *Gene* 93(1): 157-162

Balint-Kurti, P J, May, G y Churchill, A (2001) Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of Banana. *FEMS Microbiology Letters* 195: 9-15

Dadzie, B.K (1998) Post- harvest characteristics of black sigatoka resistant banana, cooking banana and plantain hybrids INIBAP

Dekeyser, R. A.; Claes, B.; De Rycke, R.M.U.; Habets, M. E.; Van Montagu, M. C.; Caplan, A. B. 1990. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell* 2: 591- 602

Durand, N, Reymond, P y Fevre, M (1991) Transformation of *Penicillium roqueforti* to phleomycin- and to hygromycin B- resistance. *Curr. Genet.* 19 (2): 149-153

Jorgensen, J H, Cleeland R, Craig WA, Doern G, Ferraro MJ, Finegold SM, Hansen SL, Jenkins SG, Novick WJ, Pfaller MA, Preston DA, Reller LB, y Swenson JM (1993) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically Approved Standard. NCCLS document M7-A3. Third Edition, Vol. 13 No 25. NCCLS.Villanova

Payne, A, Grosjean-Cournoyer, M y Hollomon, D (1998) Transformation of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* to carbendazim and hygromycin B resistance. *Curr Genet* 34: 100-104

Pérez, L (1996) Manual para el manejo integrado de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Sigatoka Amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder) en banano y plátano. FAO

Pnini- Cohen, S, Zilberstein, A, Schuster, S, Sharon, A y Eyal, Z (1996) Genetic transformation of the wheat pathogen *Septoria tritici*. *Phytopathology* 86(Suppl): 362

Robinson, J.C (1996) Bananas and Plantain. *Crop Production science in Horticulture*. 5. CAB INTERNATIONAL

Sági, L, Panis, B, Remy, S, Schoofs, H, De Smet, K, Swennen, R y Cammue, B (1995) Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via particle bombardment. *Biotechnology*. Vol 13: 481-485

Stover, R.H (1976) Distribution and cultural characteristics of pathogen causing banana leaf spot. *Tropical Agriculture*. Trinidad 53: 111-114

Walters, DA, Vetsch, CS, Potts DE, Lundquist, RC (1992) Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 189-200