

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA  
DE PLANTAS**

**Aislamiento e identificación de fitotoxinas  
hidrofílicas producidas por el hongo  
*Mycosphaerella fijiensis* Morelet**

**Tesis que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias presenta:**

**M. en C. Carlos Alberto Cruz Cruz**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Mérida, Yucatán, México**

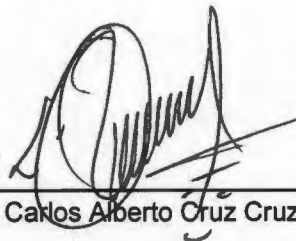
**2009**





## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



---

M. en C. Carlos Alberto Cruz Cruz

Mérida, Yucatán, 27 de Noviembre de 2009



## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez.

El trabajo fue financiado por los proyectos 61734 de SEP-CONACyT ("Identificación de metabolitos fitotóxicos hidrofilicos producidos por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y optimización de las condiciones de cultivo de *Phytophthora capsici*") y 2004-168 de SAGARPA-CONACyT ("Identificación y uso de fitoalexinas presentes en la hoja de banano (*Musa acuminata*) para el control del agente de la Sigatoka negra") y la beca CONACyT # 167115.



## AGRADECIMIENTOS

Mi eterno agradecimiento al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por confiar en mí y haberme dado la oportunidad de formar parte en su grupo de trabajo, por todo el apoyo que me brindó durante la realización del presente trabajo, por sus enseñanzas, dedicación y amistad.

A la Q.B.B. Karlina García Sosa y la Q.B.B. Fabiola Escalante Erosa por todo el apoyo brindado.

A los integrantes de mi comité tutorial y revisores de tesis: Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, Dra. Marcela Gamboa Angulo, Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, Dr. Alexandre Cardoso Taketa, Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García, Dr. Ignacio Islas Flores, Dr. Fernando Echeverri López y Dr. Jairo Cristóbal Alejo, por su apoyo, sus críticas, sus atinadas sugerencias y por el tiempo invertido en la revisión del presente trabajo.

A todos los demás profesores del CICY, por darme las herramientas necesarias y por ser parte fundamental en mi formación académica.

A mis compañeros de generación, compañeros del laboratorio y amigos del CICY, con quienes compartí muchos momentos agradables que siempre recordaré con especial cariño. Gracias "malosos" y "malosas".

En especial a la Dra. Manuela Reyes, mil gracias por toda tu disposición, paciencia y amistad. Eres un amor "Manueluluquix".

A la familia Nuñez Pastrana por todo el apoyo brindado.

No es fácil superar la distancia y el tiempo sin el apoyo incondicional de la familia. Gracias a mis padres y hermanos, por todo el amor, por confiar en mí y por brindarme su apoyo incondicional. "Gorditos (as)", los amo.

En especial a mi esposa Rosalía, gracias por todo tu apoyo, amor, comprensión, paciencia y por estar conmigo en todo momento. Eres mi ilusión e inspiración.





## DEDICATORIA

*A mi familia por confiar en mí y por brindarme su apoyo incondicional.*

*Rosalba*

*Apolinar*

*Elena*

*César*

*Lucia*

*Farrell*

*y .*

*Gael*

*Por quienes siento un inmenso amor,  
son la fuerza que me impulsa cada día a superarme en la vida.*



# ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Reconocimientos	i
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	v
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Bibliografía	1
	3
<b>CAPÍTULO 1. Antecedentes</b>	5
1.1 Interacción planta-patógeno	5
1.2 Mecanismos de infección de hongos fitopatógenos	6
1.2.1 Fitotoxinas	6
1.2.1.1 Mecanismos de acción de las fitotoxinas	13
1.2.1.2 Aplicaciones de las fitotoxinas	15
1.3 Género <i>Musa</i>	15
1.3.1 Importancia del género <i>Musa</i>	16
1.3.2 Enfermedades del banano y plátano	17
1.3.2.1 Agente causal de la Sigatoka negra:	17
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	
1.3.2.2 Sintomatología de la Sigatoka negra	18
1.3.2.3 Control de la Sigatoka negra	20
1.3.3 Fitotoxinas de <i>M. fijiensis</i>	21
<b>1.4 HIPÓTESIS</b>	25
<b>1.5 OBJETIVOS</b>	25
1.5.1 Objetivo general	25
1.5.2 Objetivos específicos	25
1.6 Procedimiento experimental	26
1.7 Bibliografía	27

<b>CAPÍTULO 2. Purificación biodirigida de las fitotoxinas hidrofílicas de <i>M. fijiensis</i></b>	<b>37</b>
2.1 Introducción	37
2.2 Production of hydrophilic phytotoxins by <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	39
2.2.1 Abstract	39
2.2.2 Introduction	40
2.2.3 Materials and methods	41
2.2.4 Results and discussion	43
2.2.5 Acknowledgments	47
2.2.6 References	48
2.3 Estrategia alterna para la purificación de fitotoxinas hidrofílicas de <i>M. fijiensis</i>	50
2.4 Materiales y métodos	51
2.4.1 Procedimientos generales	51
2.4.2 Cultivo <i>in vitro</i> de banano	51
2.4.3 Purificación del liofilizado <b>D5</b> por cromatografía en columna con gel de sílice de fase normal	52
2.4.4. Extracción del filtrado crudo liofilizado ( <b>A</b> ) con MeOH	53
2.4.5. Purificación del extracto metanólico ( <b>J1</b> ) por cromatografía líquida al vacío (VLC)	53
2.4.6 Purificación de la fracción <b>K5</b> por cromatografía en columna con gel de sílice de fase normal	53
2.4.7 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) de la fracción <b>H</b>	54
2.5 Resultados y discusión	55
2.6 Conclusiones	65
2.7 Bibliografía	66
 <b>CAPÍTULO 3. Evaluación de la selectividad, sitio y mecanismo de acción de las fitotoxinas hidrofílicas de <i>M. fijiensis</i></b>	 <b>69</b>
3.1 Introducción	69
3.2 Bibliografía	71
3.3 On the selectivity, mechanism, and sites of action of the hydrophilic phytotoxins produced by <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , the causal agent of black Sigatoka in banana plants	73
3.3.1 Abstract	73
3.3.2 Introduction	74
3.3.3 Materials and methods	75
3.3.3.1 General experimental procedures	75
3.3.3.2 Biological material	75
3.3.3.3 Culturing conditions of <i>M. fijiensis</i>	75
3.3.3.4 Methanol extraction of <b>F1</b>	76

3.3.3.5 Vacuum liquid chromatography purification of F2	76
3.3.3.6 Column chromatography purification of F4e	76
3.3.3.7 Leaf-spot assay	76
3.3.3.8 Electrolyte leakage assay	76
3.3.3.9 NBT staining	77
3.3.3.10 DAB staining	77
3.3.3.11 Statistical analysis	77
3.3.4 Results and discussion	78
3.3.5 Acknowledgments	86
3.3.6 References	87
<b>CAPÍTULO 4. Discusión general</b>	<b>93</b>
4.1 Bibliografía	96
<b>CAPÍTULO 5. Perpectivas</b>	<b>99</b>



## LISTA DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1.1	Estructuras de HST's producidas por <i>Alternaria</i> spp.	11
1.2	Estructuras de HST's producidas por <i>Cochliobolus</i> spp.	12
1.3	Estructuras de HST's producidas por <i>Phyllosticta maydis</i> ( <i>Mycosphaerella zœae-maydis</i> ) y <i>Periconia circinata</i>	12
1.4	Estructuras de las principales no-HST's	13
1.5	Clasificación taxonómica de los cultivares de banano y plátano (Robinson, 1996)	16
1.6	Ciclo de vida de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (Morelet)	18
1.7	Síntomas de las etapas 2 a 6 de la Sigatoka negra	20
1.8	Fitotoxinas aisladas del extracto lipofílico de <i>M. fijiensis</i>	23
2.1	Phytotoxic damage on banana leaf caused by the crude filtrate of <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (A) and the pigment-free fraction (B) tested at 3% (w:v)	44
2.2	Phytotoxic damage of banana leaf caused by fractions D5 and D6, obtained by vacuum liquid chromatography purification of fraction B from <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	45
2.3	Chromatographic profiles (HPLC) of phytotoxic fractions obtained by vacuum liquid chromatography of culture filtrate of <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	46
2.4	Phytotoxic damage of banana leaf caused by purified fractions from culture filtrate of <i>Mycosphaerella fijiensis</i> tested at 2% (w/v)	47
2.5	Rendimiento (en mg) de las fracciones G y H después del tratamiento de desalado	50
2.6	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Musa acuminata</i> var. Enano Gigante y plantas de 4 meses de edad establecidas en invernadero	55
2.7	Evaluación de la actividad fitotóxica de los filtrados liofilizados de <i>M. fijiensis</i> (A1-A7) al 3%	56
2.8	Diagrama general de purificación del filtrado liofilizado de cultivos de <i>M. fijiensis</i> (fracción A)	57
2.9	Perfil cromatográfico por HPLC de la fracción D5 (obtenida de la purificación por VLC de la fracción despigmentada B)	57
2.10	Perfiles cromatográficos por ccd de las fracciones I1-I7 (obtenidas de la purificación por cromatografía en columna de la fracción D5)	58
2.11	Evaluación de la actividad fitotóxica de las fracciones I1-I7 (3%), obtenidas de la purificación por cromatografía en columna de la fracción D5	58

2.12	Perfil cromatográfico por HPLC de la fracción fitotóxica <b>I5</b> (obtenida de la purificación por cromatografía en columna de la fracción <b>D5</b> )	59
2.13	Evaluación de la actividad fitotóxica de las fracciones <b>J1</b> y <b>B</b> a diferentes concentraciones	60
2.14	Comparación de los perfiles cromatográficos por ccd de fracciones despigmentadas ( <b>B</b> y <b>B'</b> ) y de extractos MeOH ( <b>J1</b> , <b>J1'</b> y <b>J1''</b> ) de filtrados liofilizados de <i>M. fijiensis</i>	60
2.15	Perfiles cromatográficos por ccd de las fracciones <b>L1-L8</b> , obtenidas de la purificación sucesiva (VLC y cromatografía en columna) del extracto MeOH del filtrado liofilizado de <i>M. fijiensis</i> ( <b>J1</b> )	61
2.16	Cromatograma de iones de la fracción <b>H</b>	62
2.17	Espectro de masas del componente principal a $t_R$ 7.39 min de la fracción <b>H</b>	62
2.18	Patrón de fragmentación del ion protonado $[M+1]$ a $m/z$ 430 uma	63
2.19	Patrón de fragmentación del ion a $m/z$ 298 uma	64
3.3.1	Phytotoxic damage caused by the hydrophilic phytotoxic metabolite <b>F5b</b> (3%) on banana leaves	80
3.3.2	Phytotoxic damage caused by hydrophilic phytotoxic metabolite <b>F5b</b> and the semi-purified fractions of <i>M. fijiensis</i> (3%) on banana leaves from <i>M. acuminata</i> cv. Grande naine growing in pots under greenhouse conditions (CICY)	81
3.3.3	Cell membrane damage (electrolyte leakage assay) caused by hydrophilic phytotoxic metabolite <b>F5b</b> and the semi-purified fractions of <i>M. fijiensis</i> (2%) on leaf discs of four-month-old banana plants growing in pots under greenhouse conditions (CICY)	83
3.3.4	Anion superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ) production in leaf discs of <i>M. acuminata</i> cv. Grande naine (black Sigatoka-susceptible), detected <i>in situ</i> by NBT staining of the plant material after different treatment times with the hydrophilic phytotoxin metabolite <b>F5b</b>	84
3.3.5	Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production in leaf discs of <i>M. acuminata</i> cv. Grande naine (black Sigatoka-susceptible) detected <i>in situ</i> by DAB staining of the plant material after different treatment times with the hydrophilic phytotoxin metabolite <b>F5b</b>	85



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.1	Fitotoxinas hospedero selectivas (HST's)	8
1.2	Estructura, genes y organización genómica de HST's	9
1.3	Posibles sitios de acción de fitotoxinas (HST's y no-HST's)	14
2.1	Contenido de nutrientes del medio Murashige-Skoog para la iniciación y mantenimiento del cultivo <i>in vitro</i> de banano	52
2.2	Condiciones de elución de la fracción H en LC-MS	54
3.3.1	Different varieties of banana and plantains with different levels of resistance to black Sigatoka	79



## RESUMEN

Las fitotoxinas se definen como metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por hongos fitopatógenos que pueden inducir necrosis, clorosis, marchitamiento o una combinación de estos síntomas en hospederos susceptibles. Dependiendo del papel que desempeñan en el proceso infeccioso, las fitotoxinas se clasifican como hospedero selectivas (HST's) y hospedero no selectivas (no-HST's). Hasta ahora se ha reportado un número limitado de fitotoxinas lipofílicas del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra, la enfermedad más destructiva del follaje de bananos y plátanos (*Musa* spp.), y recientemente se reportó la producción de fitotoxinas hidrofílicas.

Como parte de un proyecto dirigido hacia el estudio de los metabolitos fitotóxicos producidos por *M. fijiensis* y el papel de estos metabolitos en el proceso infeccioso, los objetivos principales de este trabajo fueron llevar a cabo la purificación e identificación de metabolitos fitotóxicos hidrofílicos producidos por *M. fijiensis*, y evaluar su selectividad y su posible sitio de acción.

Durante este trabajo se establecieron dos estrategias de purificación para la obtención de fitotoxinas hidrofílicas presentes en el filtrado acuoso de cultivos de *M. fijiensis*, una utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) y otra por cromatografía de gravedad. La purificación por cromatografía de gravedad permitió la obtención de la fracción fitotóxica H, con mayor rapidez y mejor rendimiento.

El análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS por sus siglas en inglés), de la fracción fitotóxica H mostró un componente mayoritario con un peso molecular de 429 uma, sugiriendo la presencia de nitrógeno en su estructura. Las fragmentaciones secuenciales del ion molecular mostraron la pérdida sucesiva de una unidad de pentosa ( $C_5H_8O_4$ ) y una de hexosa ( $C_6H_{10}O_5$ ), así como la presencia de una aglicona residual de 136 uma.

La evaluación de la fracción fitotóxica H sobre hojas de banano con diferentes grados de susceptibilidad y resistencia a la Sigatoka negra indicaron que las fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis* corresponden a fitotoxinas del tipo no-HSTs. Adicionalmente, los resultados obtenidos sugieren que 1) la actividad fitotóxica de los productos hidrofílicos no es dependiente de la luz, 2) su sitio de acción es la membrana plasmática, y 3) la inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) es parte de su mecanismo de acción durante el proceso infeccioso.



## ABSTRACT

Phytotoxins are defined as low molecular weight secondary metabolites produced by fungal phytopathogens that may cause necrosis, chlorosis, wilting, or a combination of these symptoms in susceptible plant hosts. Depending on their role in the infectious process, phytotoxins have been classified as host selective toxins (HST's) and non-host selective toxins (non-HST's). To date, a limited number of lipophilic phytotoxins have been reported from the *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, the causal agent of black Sigatoka, recognized as the most destructive foliar disease of bananas and plantains (*Musa* spp.); recently, the production of hydrophilic phytotoxins by this pathogen has also been reported.

As part of a project directed towards studying the phytotoxic metabolites produced by *M. fijiensis* and their role in the infectious process, the main objectives of this investigation were to carry out the isolation and identification of hydrophilic phytotoxic metabolites produced by *M. fijiensis*, and test their selectivity and possible site of action.

Two strategies for the purification of hydrophilic phytotoxins present in the aqueous filtrate of *M. fijiensis* cultures were established during this research, one using high performance liquid chromatography (HPLC) and the other one using column chromatography. The column chromatography purification allowed the isolation of the phytotoxic fraction H rapidly and with a better yield.

The liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of the phytotoxic fraction H showed a principal component with a molecular mass of 429 uma, suggesting the presence of nitrogen in its structure. The sequential fragmentation of the molecular ion showed the successive loss of a pentose ( $C_5H_8O_4$ ) and a hexose ( $C_6H_{10}O_5$ ) units, and the presence of a residual aglycone of 136 uma.

Evaluation of the phytotoxic fraction H on leaves of banana plants having different levels of resistance and susceptibility to black Sigatoka indicated that the hydrophilic phytotoxins produced by *M. fijiensis* correspond to non-HSTs. In addition, the results obtained suggest that 1) the phytotoxic activity of the hydrophilic metabolites is not light-dependant, 2) their site of action is the plasma membrane, and 3) the induction of reactive oxygen species (ROS) production is part of their mechanism of action during the infectious process.



## INTRODUCCIÓN

Todas las especies vegetales pueden ser atacadas durante alguna etapa de su ciclo de vida por microorganismos fitopatógenos; estos ataques pueden afectar una o más de las funciones fisiológicas vegetales (e.g. división celular, diferenciación y desarrollo, absorción de agua y minerales, fotosíntesis, metabolismo, reproducción, etc.). Cuando el ataque es producido por hongos fitopatógenos, los daños ocasionados varían desde leves, hasta la destrucción y muerte de tejidos invadidos, o del individuo en su totalidad (Herrera & Ulloa, 1998; Agrios, 2005).

Los hongos constituyen un grupo altamente versátil de organismos eucariontes heterotróficos que exitosamente han ocupado una amplia diversidad de hábitats naturales. La mayoría de los hongos son estrictamente saprófitos y en la actualidad se estima la existencia de al menos 1.5 millones de especies (Hawksworth, 2001), de las cuales aproximadamente 100,000 son conocidas. De estas últimas, menos del 10% son capaces de colonizar plantas, y una fracción aún menor son capaces de causar enfermedades en plantas (Knogge, 1996).

Los hongos han desarrollado diferentes mecanismos de infección que les permite funcionar como patógenos; estos mecanismos incluyen la síntesis y liberación de enzimas degradativas de la pared celular, la formación de estructuras especializadas, y la producción de metabolitos fitotóxicos comúnmente conocidos como fitotoxinas. Debido a su variedad estructural y sus diferentes modos de acción, las fitotoxinas son consideradas las armas especiales del patógeno, dado que durante el proceso de colonización de una especie vegetal, los hongos fitopatógenos producen metabolitos fitotóxicos que provocan diversas afecciones al tejido vegetal (e.g. clorosis, necrosis o marchitamiento) y le permiten manipular la fisiología de la célula en su beneficio (Knoche & Duvick, 1987; Knogge, 1996; Jeng-Sheng, 2001).

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Paracercospora fijiensis*) es reconocido como el agente causal de la Sigatoka negra, la enfermedad foliar más destructiva y devastadora de los cultivos de bananos y plátanos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Jones, 2000). La Sigatoka negra, provoca una disminución de hasta el 50% de la producción bananera, debido a la maduración precoz del fruto y a la reducción de la capacidad fotosintética de la planta (Robinson, 1996; Sánchez & Cárdenas, 2002). Las lesiones necróticas y cloróticas ocasionadas por *M. fijiensis* en plantas de banano y plátano sugieren la participación de una o varias fitotoxinas (Upadhyay *et al.*, 1990).

Aún cuando se ha reportado un número limitado de fitotoxinas lipofílicas obtenidas del extracto orgánico crudo de cultivos de *M. fijiensis* (Stierle, 1991; Upadhyay, 1991; Hoss *et al.*, 2000), hasta ahora no se han reportado fitotoxinas hidrofílicas producidas por este fitopatógeno. Sin embargo, recientemente se reportó la presencia de actividad fitotóxica, tanto en el extracto orgánico crudo como en la fase acuosa residual, obtenidos a partir de filtrados de cultivos de *M. fijiensis* (Puch-Ceh, 2001). Lo anterior sugiere que este fitopatógeno produce dos grupos de metabolitos fitotóxicos, uno de naturaleza lipofílica y otro de naturaleza hidrofílica.

Con base en lo anterior, en este trabajo se planteó como objetivo principal aislar e identificar metabolitos fitotóxicos hidrofílicos presentes en la fase acuosa del filtrado de cultivo de *M. fijiensis* y evaluar su papel en el proceso infeccioso.



## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp. 175-248.
- Hawksworth, D. L. (2001). *The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited*. *Mycology Research*, 105(12), 1422-1432.
- Herrera, T. y M. Ulloa (1998). *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V. pp. 375-377.
- Hoss, R., J. Helbig and H. Bochow (2000). *Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (Musa spp.-Mycosphaerella fijiensis)*. *Journal of Phytopathology*, 148, 387-394.
- Jeng-Sheng, H. (2001). *Plant Pathogenesis and resistance: Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. pp. 292-383.
- Jones, D. R. (2000). *Diseases of banana, abaca and ensent*. Cab Publishing, New York. pp. 1-4, 37, 72-75.
- Knoche, H. and J. Duvick (1987). "The role of fungal toxins in plant disease", in *Fungal Infection of Plants. Symposium of the British Mycological Society*, Pegg G. F and P. G. Ayres (eds). Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney. pp. 158-192.
- Knogge, W. (1996). *Fungal Infection of Plants*. *The Plant Cell*, 8, 1711-1722.
- Puch-Ceh, M. A. (2001). *Evaluación de la actividad fitotóxica en cultivos de Mycosphaerella fijiensis Morelet mediante el uso de diferentes técnicas de bioensayo*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. pp. 57-58, 61-64.
- Robinson, J. C. (1996). *Bananas and plantains*. University Press Cambridge, UK. pp. 1-3.

- Sánchez, M. and W. Cárdenas (2002). *Producción de anticuerpos policlonales contra el hongo causante de la Sigatoka negra, Mycosphaerella fijiensis*. Revista Tecnológica, 15(1), 55-61.
- Stierle, A. A., R. Upadhyay., J. Hershenhorn., G. A. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains*. Experientia, 47, 853-858.
- Upadhyay, R. K., G. A. Strobel., S. J. Coval and J. Clardy (1990). *Fijiesin, the first phytotoxin from M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease*. Experientia, 47, 982-984.

# CAPÍTULO 1

## Antecedentes

### 1.1 INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Bajo condiciones naturales, las plantas están sujetas al ataque de una gran diversidad de microorganismos patogénicos. Sin embargo, como consecuencia de la coevolución de las plantas con estos microorganismos, las especies vegetales han desarrollado diferentes barreras de defensa. Estas barreras pueden ser físicas (e.g. cutícula), fisiológicas (e.g. reacción hipersensible, resistencia sistémica adquirida, resistencia sistémica inducida) o químicas [e.g. fitoprotectores constitutivos (fitoanticipinas) e inducibles (fitoalexinas)], cuyo fin es detener el ataque de agentes patógenos o contrarrestar la severidad de la infección (Agrios, 2005; Hammond-Kosack & Jones, 2000; VanEtten, 1994; Glazebrook, 2005).

Las plantas tienen la capacidad de percibir una amenaza mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs), también llamados inductores generales; los PAMPs son moléculas microbianas ampliamente distribuidas, tales como lipopolisacáridos, flagelina y proteínas de choque térmico capaces de actuar como inductores de defensa. Además, las plantas también han desarrollado sistemas sofisticados de reconocimiento para detectar proteínas específicas producidas durante la infección por una raza específica de un patógeno (Martin *et al.*, 2003; Alfano & Collmer, 2004). En la teoría de reconocimiento gen por gen (Flor, 1971), la presencia o ausencia de genes de resistencia (*R*) en la planta y de genes (*AVR*) en el patógeno, determina el reconocimiento del microorganismo invasor y define si la interacción es compatible (infección) o incompatible (no infección) (Keen, 1990; Jackson, 1996).

La respuesta de la planta a la infección del patógeno puede determinar la dispersión del patógeno y el grado del daño causado por éste. Durante una interacción compatible (hospedero susceptible y patógeno virulento), el patógeno se dispersa desde el punto de entrada y causa daño celular más allá del sitio de infección; es decir, el patógeno no es reconocido por la planta, por lo cual, las respuestas de defensa no se activan y la enfermedad se establece. Sin embargo, durante una interacción incompatible (hospedero resistente y patógeno avirulento/virulento), existe un reconocimiento del patógeno por parte de la planta que activa la

expresión de los mecanismos de defensa, por lo cual, la muerte celular es limitada al sitio de infección y la colonización de la planta por el patógeno es reducida (Keen, 1990; Jackson, 1996; Ciardi *et al.*, 2000).

## **1.2 MECANISMOS DE INFECCIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS**

El desarrollo de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos ocurre como resultado de la acción individual o combinada de los mecanismos de infección. Para evadir las barreras físicas de las plantas, las bacterias y los hongos penetran por aberturas naturales (e.g. estomas, lenticelas y hidátodos); en tanto que los virus y algunas especies de bacterias pueden ser inyectados directamente a los tejidos de la planta por insectos que succionan la savia del floema (Knogge, 1996). Adicionalmente, se ha establecido que los mecanismos de infección de algunos hongos fitopatógenos involucran la secreción de enzimas hidrolíticas (e.g. cutinasas, peptinasas y celulasas), las cuales degradan los componentes estructurales de la pared celular y facilitan la colonización de la planta, o la formación de estructuras especializadas (e.g. apresorios) para penetrar la epidermis.

Una vez que el hongo ha colonizado a la planta hospedera, éste puede desarrollarse bajo condiciones biotróficas, necrotróficas o hemibiotróficas. Los hongos biotróficos, también conocidos como parásitos obligados o estrictos, obtienen los nutrientes del hospedero mientras las células infectadas permanecen vivas y aparentemente sanas. Los hongos necrotróficos matan a las células del hospedero desde las etapas tempranas del parasitismo, por lo que viven y se alimentan como saprobios a partir de los tejidos muertos. Finalmente los hongos hemibiotróficos actúan como hongos biotróficos y necrotróficos en diferentes etapas de la infección (Knogge, 1996; Herrera & Ulloa, 1998; Idnurm & Howlett, 2001).

Las enfermedades causadas por hongos necrotróficos y hemibiotróficos en plantas producen síntomas tales como clorosis, necrosis, marchitamiento y pudrición de una parte o de la planta completa. A menudo, estas afecciones al tejido vegetal ocurren como consecuencia de la liberación de metabolitos tóxicos, comúnmente denominados fitotoxinas.

### **1.2.1 Fitotoxinas**

Las primeras evidencias sobre la importancia de las fitotoxinas en el desarrollo de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos aparecieron durante la década de los setentas (siglo XX), como consecuencia de las epidemias causadas por hongos del género

*Helminthosporium* en cultivos de avena y maíz en los Estados Unidos, y las causadas por fitopatógenos del género *Alternaria* en cultivos de pera y manzana en Japón (Kohmoto *et al.*, 1987; Gomés *et al.*, 1996). En cada una de estas epidemias, los efectos destructivos de los patógenos se atribuyeron directamente a la acción de sus fitotoxinas, demostrándose la existencia de una relación directa entre la producción de estos metabolitos por el microorganismo y su capacidad para infectar a la planta.

Como consecuencia de estos primeros trabajos, las fitotoxinas se definieron como metabolitos secundarios de bajo peso molecular (menor de 2000 uma), que perturban el crecimiento normal de las plantas superiores causando necrosis, clorosis, marchitamiento o una combinación de estos síntomas en hospederos susceptibles. Al mismo tiempo, las fitotoxinas se clasificaron, de acuerdo con el papel que juegan en el proceso de infección en la planta, como fitotoxinas hospedero selectivas (HST's) y fitotoxinas hospedero no selectivas (no-HST's) (Macri *et al.*, 1983; Knoche & Duvick, 1987; Walton, 1996).

Las HST's se consideran como determinantes primarios de patogenicidad debido a que son requeridas por el patógeno para colonizar la planta; estas fitotoxinas inducen los síntomas de la enfermedad aún en ausencia del hongo y son tóxicas únicamente al o los hospederos del patógeno que las produce (Scheffer & Livingston, 1984; Walton, 1996; Prell & Day, 2000; Jeng-Sheng, 2001).

Por otra parte, las no-HST's afectan a un rango más amplio de hospederos, causando una variedad de síntomas. Estos metabolitos por tanto no son esenciales para el inicio de la infección, pero contribuyen a la virulencia del patógeno, por lo que se les reconoce como determinantes secundarios de patogenicidad (Mitchell, 1984; Prell & Day, 2000; Jeng-Sheng, 2001).

Dada su importancia por la función que desempeñan en el proceso infeccioso, las HST's han recibido la mayor atención y en la actualidad se conocen aproximadamente 40 HST's (Tabla 1.1) (Kohmoto & Otani, 1991). Para un número importante de estos metabolitos se conoce su estructura química, sus genes de biosíntesis y su organización genómica (Tabla 1.2) (Markham & Hille, 2001).

Tabla 1.1. Fitotoxinas hospedero selectivas (HST's).

<b>Patógeno</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Toxina(s)</b>
<i>Alternaria mali</i>	Manzana	AM I, II y III
<i>A. tenuissima</i>	Chícharo	ATC
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomate	AL I y II
<i>A. alternata</i> p. fresa	Fresa	AF I, II y III
<i>A. kikuchiana</i>	Pera	AK I y II
<i>A. citri</i> p. limón	Limón	ACR I, ACT I y II
<i>A. citri</i> p. tangerina	Tangerina	ACTG A y B
<i>A. longipes</i>	Tabaco	AT
<i>Bipolaris sacchari</i>	Caña de azúcar	HS A, B y C
<i>Cochiobolus carbonum</i> raza 1	Maíz	HC I, II y III
<i>C. heterostrophus</i> raza T	Maíz	HM 1, 2, 3 y 1'
<i>C. victoriae</i>	Avena	HV
<i>Corynespora cassicola</i>	Tomate	CC
<i>Phyllosticta maydis</i>	Maíz	PM A, B, C y D
<i>Periccnia circinata</i>	Sorgo	Peritoxina

Tabla 1.2. Estructura, genes y organización genómica de HST's.

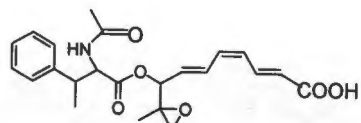
Patógeno	Toxina	Estructura	Genes conocidos para su biosíntesis	Locus, cromosoma identificado
<i>Cochliobolus carbonum</i>	HC	Tetrapéptido cíclico	<i>HTS1, TOXA, TOXC, TOXD, TOXE, TOXF, TOXG</i>	Locus <i>TOX2</i> , cromosoma 3.5 o 2.2 Mpb
<i>C. heterostrophus</i>	T	Policétido	<i>PKS1, DEC1</i>	Loci <i>TOX1A</i> y <i>TOX1B</i> , cromosomas translocados 12;6 y 6;12
<i>C. victoriae</i>	Victorina	Pentapéptido cíclico	Desconocido	<i>TOX3</i> , localización desconocida
<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	AAL	Aminopentol éster	Desconocido	Desconocido
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>kikuchiana</i>	AK	Ác. Epoxi-decatrienoico en su estructura	<i>AKT1, AKT2, AKTR-1, AKT3-1, AKTR-2, AKT3-2</i>	Locus <i>AKT</i> , cromosoma 4.1 Mpb
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>fragariae</i>	AF	Ác. Epoxi-decatrienoico en su estructura	Homólogos <i>AKT1, AKT2</i> Y <i>AKT3</i>	Desconocido
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>tangerina</i>	ACT	Ác. Epoxi-decatrienoico en su estructura	Homólogos <i>AKT1, AKT2</i> Y <i>AKT3</i>	Desconocido
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>mali</i>	AM	Tetra depsipéptido cíclico	<i>AMT</i>	Locus <i>AMT</i> , cromosoma 0.7 Mpb

Aunque la mayoría de las HST's son producidas por especies o patotipos de los géneros *Alternaria* y *Cochliobolus* (Fig. 1.1 y 1.2), existen HST's producidas por otros fitopatógenos, e.g. la toxina PM (Fig. 1.3a), producida por *Phyllosticta maydis* (*Mycosphaerella zeaе-maydis*), y la peritoxina (Fig. 1.3b), producida por *Periconia circinata* (Walton, 1996; Prell & Day, 2000; Jeng-Sheng, 2001).

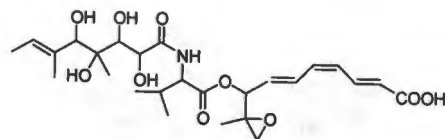
Las HST's conocidas hasta ahora pertenecen a diferentes familias químicas incluyendo péptidos cíclicos, terpenoides, oligosacáridos, policétidos y metabolitos de biogénesis incierta y son causantes de una amplia gama de efectos biológicos. Algunas HST's se encuentran químicamente relacionadas con otros productos tóxicos, e.g. la toxina AAL (Fig. 1.1g), producida por *Alternaria alternata*, se relaciona estructuralmente

con la micotoxina fumonisina, producida por *Fusarium moniliforme* (Gilchirst *et al.*, 1995), en tanto que la toxina HC (Fig. 1.2b) comparte, con otros cuatro terpenoides cíclicos producidos por hongos filamentosos no relacionados, la unidad "Aeo" (ácido 2-amino-9,10-epoxi-8-decanoico) (Walton, 1996). Otras HST's que se encuentran químicamente relacionadas entre sí son la toxina T (Fig. 1.2c) de *Cochiobolus heterostrophus* y la toxina PM (Fig. 1.3a) de *M. zea-maydis*; estas HST's son similares en estructura y en hospederos, pero son producidas por hongos diferentes. Las toxinas AK (Fig. 1a), ACT (Fig. 1.1b) y AF (Fig. 1.1c), producidas por tres patotipos de *A. alternata* con diferentes gama de hospederos (pera japonesa, tangerina y fresa, respectivamente) (Kohmoto & Otani, 1991; Otani *et al.*, 1995), presentan una unidad estructural en común, el ácido 9,10-epoxi-9-metildecatrinoico (Walton, 1996). Finalmente, algunas HST's como la victorina, producida por *C. victoriae* (Fig. 1.2a), y la peritoxina, producida por *Periconia circinata* (Fig. 1.3b), son particularmente inusuales debido a la presencia de halógenos en su estructura.

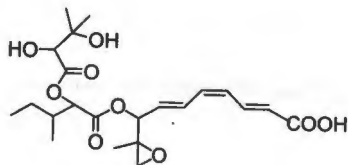




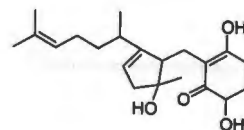
(a) Toxina AK (*Alternaria alternata*, patotipo para japonesa)



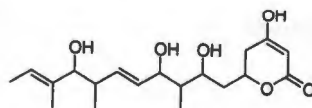
(b) Toxina ACT (*Alternaria alternata*, patotipo tangerina)



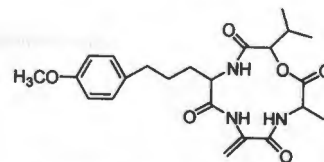
(c) Toxina AF (*Alternaria alternata*, patotipo freza)



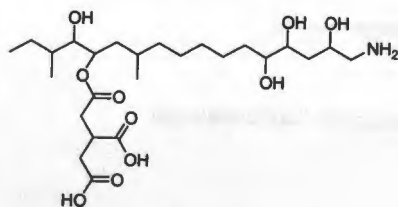
(d) Toxina ACTG (*Alternaria alternata*, patotipo tangerina)



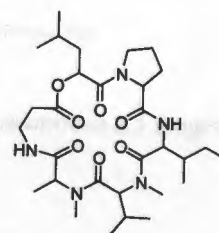
(e) Toxina ACR (*Alternaria alternata*, patotipo limón)



(f) Toxina AM (*Alternaria alternata*, patotipo manzana)

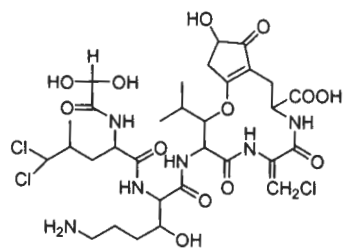


(g) Toxina AAL (*Alternaria alternata* f. sp. lycopersic)

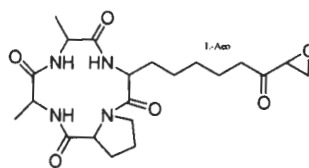


(h) Destruxina B (*Alternaria brassicae*)

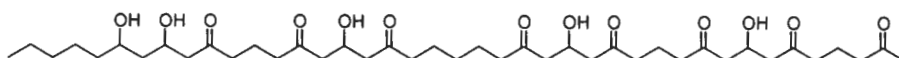
Figura 1.1. Estructuras de HST's producidas por *Alternaria* spp.



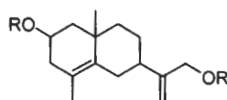
(a) Victorina (*Cochliobolus victorinae*)



(b) Toxina HC (*Cochliobolus carbonum* raza 1)



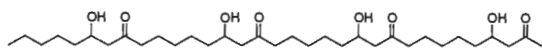
(c) Toxina T (*Cochliobolus heterostrophus* raza T)



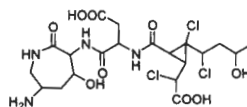
R= 5-O-(β-galactofuranosil)-β-galactofuranósido

(d) Toxina HS (*helminthospórido*) (*Bipolaris sacchari*)

**Figura 1.2.** Estructuras de HST's producidas por *Cochliobolus* spp.



(a) Toxina PM [*Phyllosticta maydis* (*Mycosphaerella zeae-maydis*)]



(b) Peritoxina (*Periconia circinata*)

**Figura 1.3.** Estructuras de HST's producidas por *Phyllosticta maydis* (*Mycosphaerella zeae-maydis*) y *Periconia circinata*.

En la actualidad se conocen al menos 200 no-HST's. Entre las no-HST's que han recibido mayor atención se encuentran la brefeldina A (Fig. 1.4a), producida por *Penicillium decumbens* y *Alternaria carthami*; la cercosporina (Fig. 1.4b), de *Cercospora kikuchii* y otras especies de *Cercospora*; la fusicoccina A (Fig. 1.4c), de *Fusicoccum amygdali*; la ofiobolina A (Fig. 4d), de *Cochliobolus miyabeanus*; la tentoxina (Fig. 1.4e), de *Alternaria alternata*; el zinniol (Fig. 1.4f), producido por *Alternaria* spp.; y el ácido fusárico, producido por *Fusarium* spp. (Rudolph, 1976; Mitchell, 1984; Ballio, 1991; Prell & Day, 2000; Jeng-Sheng, 2001).

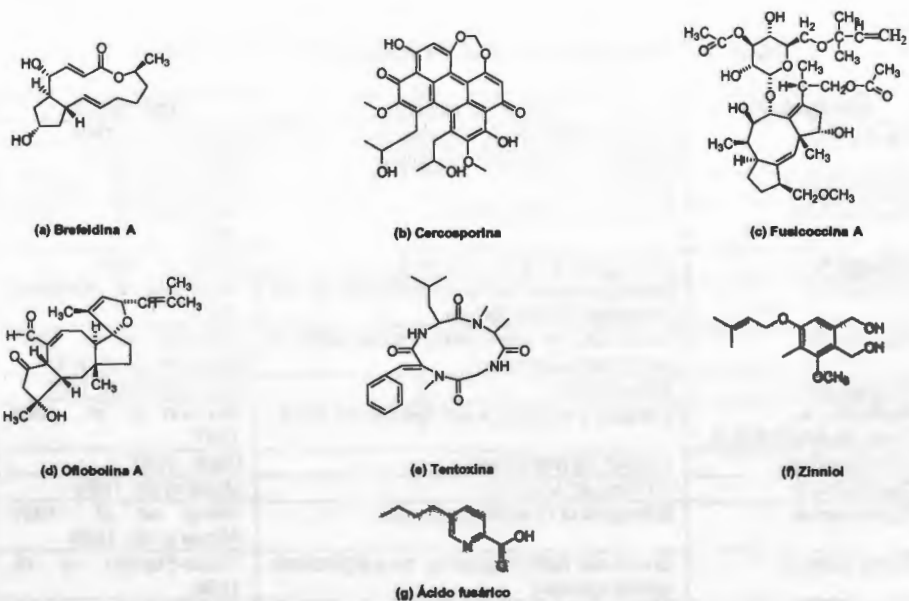


Figura 1.4. Estructuras de las principales no-HST's.

### 1.2.1.1 Mecanismos de acción de las fitotoxinas

Hasta ahora solo se han establecido los sitios de acción de un número limitado de fitotoxinas (Tabla 1.3). En general, la mayoría de las fitotoxinas afectan la estructura y la función de la membrana plasmática y de los organelos subcelulares, además de las actividades enzimáticas y la regulación del crecimiento.

Muchas, si no todas, las HST's actúan interrumpiendo los procesos bioquímicos y, en la mayoría de los casos, la muerte celular resultante tiene

la característica de una muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés) (Walton, 1996; Wolpert *et al.*, 2002). La PCD ocurre cuando una célula contribuye activamente hacia su propia muerte, pudiendo ser ésta rápida y localizada (e.g. respuesta hipersensible) o lenta (e.g. senescencia). Se ha reportado que el tratamiento de tejidos susceptibles de avena con la fitotoxina victorina o la fitotoxina AAL induce cambios fisiológicos y moleculares asociados con la PCD (Otani *et al.*, 1995). Asimismo, se ha demostrado que inhibidores de la síntesis de proteínas también inhiben la muerte celular causada por las fitotoxinas AK y AM en plantas susceptibles, sugiriendo una PCD como parte del mecanismo de acción de estas fitotoxinas (Walton, 1996).

**Tabla 1.3.** Posibles sitios de acción de fitotoxinas (HST's y no-HST's).

<b>Fitotoxinas</b>	<b>Sitio de acción</b>	<b>Referencia</b>
Toxina AAL	Aspartato carbamoil transferasa	Abbas <i>et al.</i> , 1994
	Esfinganina N-acetiltransferasa	Gilchrist, 1983
Toxina ACRL	Mitocondrias	Akimitsu <i>et al.</i> , 1989
Toxinas ACT	Proteínas de membrana	Nishimura & Kohmoto, 1983
Toxinas AF	Fosfolipasas microsomales A <sub>2</sub>	Lee <i>et al.</i> , 1992
Toxinas AK	Moléculas que contienen sulfhidrido en las proteínas de membrana	Nishimura & Kohmoto, 1983
Toxinas AM	Proteínas de membrana, cloroplastos y actividad fotosintética	Kohmoto <i>et al.</i> , 1987; Miyashita <i>et al.</i> , 2003
Toxinas AT	Mitocondrias	Kohmoto <i>et al.</i> , 1987
Brefeldina A, 7-dehidrobrefeldina A	Función y estructura del Aparato de Golgi	Driouich <i>et al.</i> , 1993, 1997
Cercosporina	Lípidos de membrana	Daub, 1982
Destruixina B	ATPasa-H <sup>+</sup> Vacuolar	Muroi <i>et al.</i> , 1994
Fumonisininas	Esfinganina N-acetiltransferasa	Wang <i>et al.</i> , 1991; Abbas <i>et al.</i> , 1994
Acido fusárico	Succinato dehidrogenasa: $\alpha$ -cetoglutarato dehidrogenasa	Talles-Pupulin <i>et al.</i> , 1996
Fusicoccina	ATPasa-H <sup>+</sup> de membrana	Johansson <i>et al.</i> , 1993
Toxinas HC	Histonas deacetilasas	Brosch <i>et al.</i> , 1995
Toxinas HMT	Proteína URF en mitocondrias Tms	Dewey <i>et al.</i> , 1988
Toxinas HS	Proteínas de membrana	Schröter <i>et al.</i> , 1985
Toxinas HV	Proteínas de membrana de 100 KD	Wolpert & Macko, 1989
Ofiobolina A	Lisina 75 de calmodulina	Leung <i>et al.</i> , 1985; Au <i>et al.</i> , 2000
Toxinas PM	Proteína URF13 en mitocondrias Tms	Dewey <i>et al.</i> , 1988

### 1.2.1.2 Aplicaciones de las fitotoxinas

Entre las principales aplicaciones de las fitotoxinas se incluye su utilización como sondas para comprender mejor los procesos involucrados en la interacción hospedero-patógeno, y su empleo para mejorar el conocimiento de los procesos bioquímicos y fisiológicos afectados durante la infección; estos últimos incluyen las funciones de los receptores de membrana, las bombas iónicas, la fotosíntesis, la transpiración, la apertura estomática, la toma de agua y la translocación de nutrientes (Ballio, 1991; Kohmoto & Otani, 1991).

Otras aplicaciones prácticas de las fitotoxinas incluyen su potencial aplicación como herbicidas naturales (Strobel, 1991) y como herramientas de selección para la generación *in vitro* de líneas de plantas resistentes a enfermedades (Harelimana *et al.*, 1997; Okole & Schulz, 1997).

### 1.3 GÉNERO *Musa*

El banano y el plátano, musáceas del orden *Zingiberales*, son plantas herbáceas perennes comprendidas dentro de las monocotiledóneas, originarias del Sureste Asiático, considerado el centro de mayor diversidad genética en el mundo. La familia *Musaceae* está constituida por dos géneros: *Ensete* y *Musa*. El género *Musa* se subdivide en cuatro secciones con base en el número cromosómico y las características morfológicas de sus miembros: *Australimusa*, *Calimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*, siendo este último el más grande y de mayor distribución geográfica (Jones, 2000). La sección *Eumusa* es la de mayor interés económico dado que incluye la mayor parte de los cultivares conocidos de bananos y plátanos, resultantes de la hibridación entre especies silvestres de *M. acuminata* Colla (genoma AA) y *M. balbisiana* Colla (genoma BB) (Jones, 2000).

El término *M. acuminata* se emplea para designar las formas puras diploides (AA) y triploides (AAA) sin semillas, conocidos como bananos de postre, e.g. "Pisang Mas" y Enano Gigante, respectivamente. El término *M. balbisiana* se aplica a las formas diploides (BB) y triploides (BBB) de plátanos de cocción sin semillas como "Abuhon" y Saba, respectivamente (Crouch *et al.*, 1998). Para designar las diferentes variedades se acepta internacionalmente que los cultivares de bananos sean referidos por el nombre genérico de *Musa*, seguidas por un código que denota el grupo genómico y el nivel de poliploidía, seguido por el nombre del subgrupo (si lo tiene) y el nombre popular del cultivar, e.g. el cultivar "Enano Gigante" se designa correctamente como *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) "Enano Gigante" (Fig. 1.5) (Robinson, 1996).

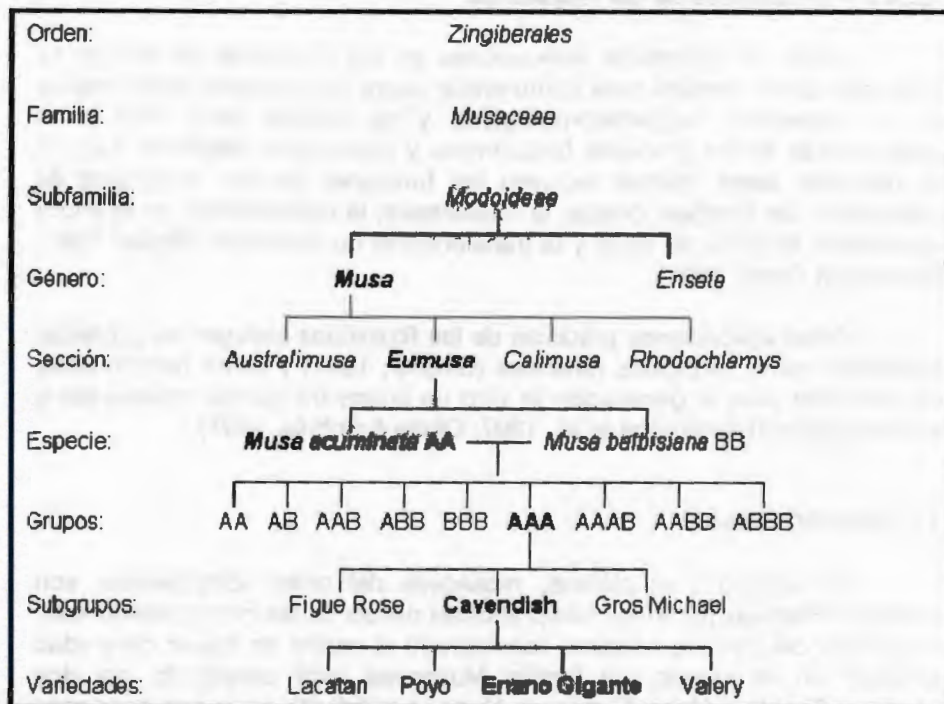


Figura 1.5. Clasificación taxonómica de los cultivares de banano y plátano (Robinson, 1996).

### 1.3.1 Importancia del género *Musa*

El banano (*Musa* AAA) y el plátano (*Musa* AAB, ABB) representan el cuarto cultivo alimentario más importante después del maíz, el arroz y el trigo (Sánchez & Cárdenas, 2002); ambos se consideran cultivos importantes a nivel mundial, no sólo como objeto de exportación, fuente fundamental de divisas para muchos países, sino también como parte fundamental de la dieta básica de muchas familias en los trópicos, dado que representan una fuente rica en carbohidratos, fibra, vitaminas (A, B6 y C), potasio, fósforo y calcio (Sotto & Rabara, 2000; Manzo *et al.*, 2001; Mohan *et al.*, 2004).

La producción anual de banano y plátano en el mundo asciende a 99 millones de toneladas, siendo los países de América Latina los principales exportadores de fruta fresca hacia los Estados Unidos y Europa. Del total de la producción de dichos países solo el 15% se exporta y el resto se destina al consumo local y a la industrialización (FAO, 2003).

En México, el cultivo de banano y plátano ocupa una superficie de 77, 301 hectáreas que producen 2.2 millones de toneladas de fruta. Los principales estados productores son Chiapas, Veracruz, Tabasco, Nayarit, Colima, Michoacán, Oaxaca, Jalisco y Guerrero (Orozco-Santos & Orozco-Romero, 2004).

### 1.3.2 Enfermedades del banano y plátano

La Sigatoka negra, causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, es la enfermedad foliar más destructiva y devastadora de los cultivos de bananos y plátanos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Jones, 2000). Otras enfermedades que afectan a las plantaciones bananeras incluyen a la Sigatoka amarilla, causada por el hongo *Mycosphaerella musicola* Leach (Stover, 1980; Marín *et al.*, 2003); el Mal de Panamá, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* sp. cubense; el Moko, una enfermedad vascular provocada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*; el Cogollo racemoso, causado por *Erwinia* sp.; el virus "Bunchy Top" (BBTV); y el nematodo barrenador (*Rodopholus similis*); el barrenador del tallo del banano (*Odoiporus longicollis*); y el picudo negro del banano (*Cosmopolitas sordidus*) (Jones, 2000; Orozco-Santos *et al.*, 2004).

#### 1.3.2.1 Agente causal de la Sigatoka negra: *Mycosphaerella fijiensis*

*M. fijiensis* es un patógeno hemibiotrófico que inicialmente se desarrolla bajo condiciones biotróficas, sin dañar las células de la planta en forma directa. Se alimenta del apoplasto, lo que ocasiona clorosis y reduce la fotosíntesis en las plantas de bananos y plátanos (Okole & Schultz, 1997). Sin embargo, al aumentar la biomasa del hongo y su demanda de nutrientes, *M. fijiensis* se convierte en un organismo necrotrófico e induce la muerte celular, viviendo como saprobio, alimentándose de los tejidos muertos (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

*M. fijiensis* es un hongo con un alto nivel de diversidad genética (Carlier *et al.*, 1996; Hayden *et al.*, 2003) que se reproduce en forma sexual (ascosporas) y asexual (conidios) durante su ciclo de vida (Fig. 1.6) (Garry, 1993; González, 1975).

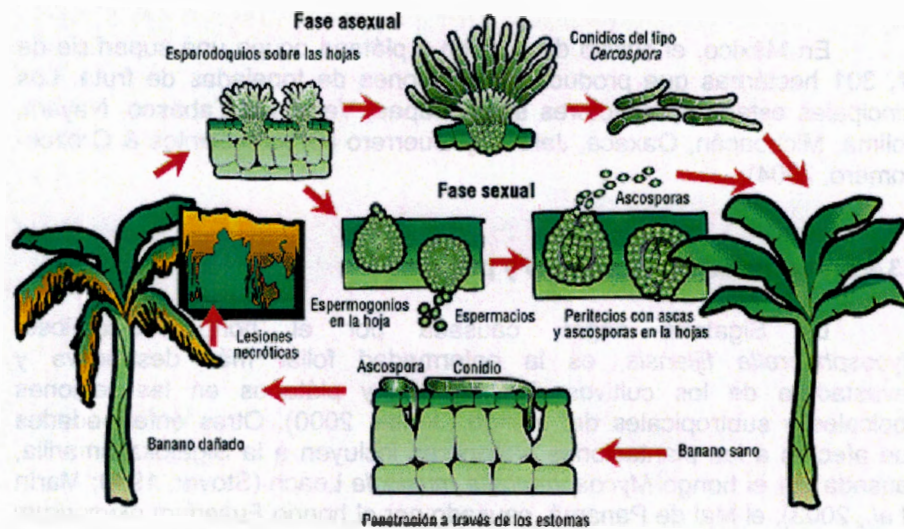


Figura 1.6. Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) (tomado de Bayer Crop Science, 2005).

La fase sexual del hongo es la más importante para el desarrollo de la Sigatoka negra, ya que durante esta fase se producen un gran número de ascosporas en estructuras llamadas pseudotecios (peritecios). Las esporas y los conidios (producidos en la fase asexual) se desplazan por acción del viento y la lluvia y germinan en las hojas; los tubos germinativos recién emergidos penetran a través de los estomas, para después proliferar en el tejido intercelular de la planta (Meredith & Lawrence, 1969; Stover, 1980; Marín *et al.*, 2003). El patógeno establece entonces una relación biotrófica durante 3 a 4 semanas, antes de la aparición de los síntomas necróticos (Hoss *et al.*, 2000). El desarrollo de la enfermedad se favorece con una alta humedad, mientras que las temperaturas menores de 20 °C y condiciones de baja humedad inhiben el crecimiento del hongo (Jones, 2000).

### 1.3.2.2 Sintomatología de la Sigatoka negra

La Sigatoka negra fue detectada en 1963 en las islas Fiji (Rhodes, 1964), pero fue hasta 1969 que Meredith & Lawrence dieron una descripción detallada de los síntomas. Basándose en estas observaciones, Fouré (1982) redefinió en seis etapas principales los síntomas mostrados durante el desarrollo de la enfermedad (Fig. 1.7):



- **Etapa 1.** Se caracteriza por una primera fase de pequeños puntos blancos y amarillos en la zona del envés de la hoja, que no son visibles a través de la hoja, y por una segunda fase en la cual los puntos se vuelven de color café rojizo. Los puntos miden menos de 1 mm de diámetro.
- **Etapa 2.** Los puntos se expanden y se convierten en bandas angostas de color café rojizo. Por lo general, estas estrías o bandas miden de 2 a 5 mm de longitud y son visibles en el haz y el envés de la hoja.
- **Etapa 3.** Las estrías aumentan su longitud a 20-30 mm. El color de éstas cambia de rojizo a café oscuro.
- **Etapa 4.** Las estrías se engrosan y forman una mancha de color café oscuro en la parte inferior de la hoja y negra en la parte superior.
- **Etapa 5.** Se caracteriza por la presencia de manchas negras en ambos lados de la hoja. El centro de la mancha comienza a deprimirse y se observa un halo amarillento (clorótico) alrededor de la mancha.
- **Etapa 6.** La porción central de las lesiones se seca y cambia de color a un gris claro. La mancha está comúnmente rodeada por un borde negro bien definido, que a su vez se encuentra rodeado por un halo de color amarillo brillante.

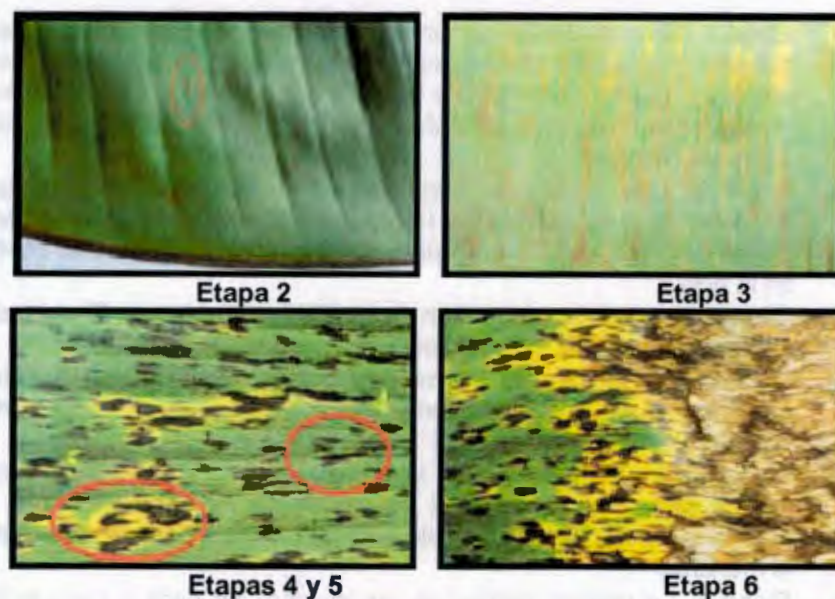


Figura 1.7. Síntomas de las etapas 2 a 6 de la Sigatoka negra (tomado de Marín *et al.*, 2003).

### 1.3.2.3 Control de la Sigatoka negra

Para combatir la enfermedad, como parte fundamental de una estrategia cultural de control, a menudo se adoptan prácticas de cultivo que reducen las condiciones microclimáticas favorables para su desarrollo, e.g. el deshoje, el deshije y el control de maleza (Orozco-Santos & Orozco-Romero, 2004). Recientemente se ha llevado a cabo estudios exploratorios para el control biológico de la Sigatoka negra, utilizando cepas de *Bacillus cereus* y *Serratia entomophila*, que compiten con *M. fijiensis* (Marín *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta ahora, el combate de la enfermedad se basa, principalmente, en estrategias de aplicación de fungicidas asociadas a un manejo integral del cultivo (Douglas & Ronal, 1992). Los fungicidas comúnmente utilizados pueden agruparse en tres categorías: protectores, de acción sistémica local, y sistémicos. Los fungicidas protectores (e.g. ditiocarbamatos y el clorotalonil) no penetran las hojas, en tanto que los de acción sistemática local (e.g. tridemorph) penetran en las hojas pero no se translocan al resto de la planta; finalmente, los sistémicos son productos que generalmente actúan sobre un paso específico en la fisiología del patógeno. Entre estos últimos se encuentran fungicidas con diferentes modos de acción, pertenecientes a diferentes familias químicas (e.g. los benzimidazoles y los triazoles) (Vargas, 1998; Jones, 2000). Sin embargo, el uso indiscriminado de fungicidas para el control de *M. fijiensis* ha

incrementado la generación de cepas resistentes a estos productos, dificultando el control de la Sigatoka negra, incrementando los costos de producción y causando problemas de contaminación del ambiente en las áreas de cultivo.

En la actualidad, se considera que el uso de fungidas representa cerca del 30% del total de los costos de producción, por lo que el desarrollo de cultivos de bananos y plátanos resistentes a la Sigatoka negra representa una alternativa importante para reducir o eliminar los problemas antes mencionados. En la actualidad existen varios híbridos obtenidos por mejoramiento convencional que presentan tolerancia a la Sigatoka negra y recientemente se ha utilizado herramientas de ingeniería genética para generar plantas transgénicas de cultivares resistentes a la Sigatoka negra (Fullerton & Olsen, 1995). Sin embargo, el interés comercial por estas variedades es limitado dado que su fruto es poco aceptado por el consumidor.

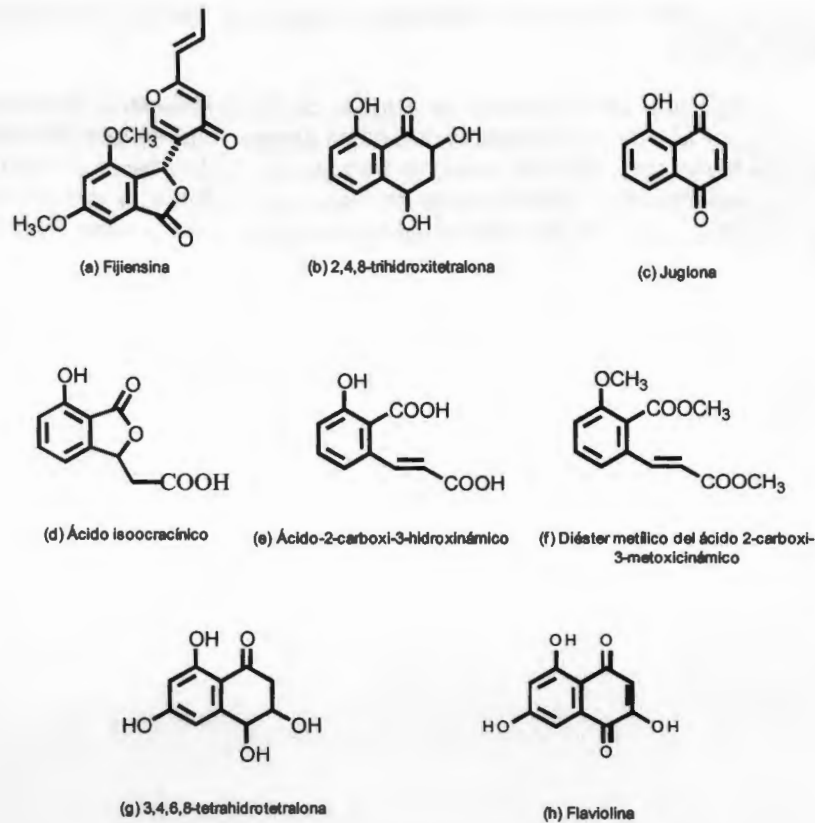
### 1.3.3 Fitotoxinas de *M. fijiensis*

Las lesiones necróticas y cloróticas ocasionadas por *M. fijiensis* en plantas de banano y plátano sugieren la participación de una o varias fitotoxinas (Upadhyay *et al.*, 1990). En un estudio sobre la actividad fitotóxica de extractos crudos de *M. fijiensis* sobre hojas de siete cultivares con diferente nivel de resistencia, se observó que el cultivar Enano Gigante (altamente susceptible) presentó la mayor sensibilidad a los extractos y un daño similar al causado por el patógeno en el campo (Molina & Krausz, 1989). La primera fitotoxina aislada de *M. fijiensis* fue la fijiensina (Fig. 1.8a), un producto aromático propuesto inicialmente como una HST con base en su especificidad para provocar lesiones necróticas únicamente en plantas de banano (Upadhyay *et al.*, 1990). Otras fitotoxinas aisladas del extracto orgánico de filtrados de cultivos del hongo son la 2,4,8-trihidroxitetralona (la más abundante y de mayor actividad), designada como HST con base a su capacidad de mimetizar al patógeno que la produce (Fig. 1.8b), la juglona (Fig. 1.8c), el ácido isochracínico (Fig. 1.8d), el ácido 2-carboxi-3-hidroxicinámico (Fig. 1.8e), el diéster metílico del ácido 2-carboxi-3-metoxicinámico (Fig. 1.8f), la 3,4,6,8-tetrahidrotetralona (Fig. 1.8g), y la flaviolina (Fig. 1.8h) (Stierle *et al.*, 1991; Hoss *et al.*, 2000). Cabe mencionar que algunas fitotoxinas de *M. fijiensis* (e.g. la 2,4,8-trihidroxitetralona, la juglona y la 3,4,6,8-tetrahidrotetralona) son intermediarios de la ruta de las melaninas (Stierle *et al.*, 1991).

Con respecto al estudio de los mecanismos de acción de las fitotoxinas producidas por *M. fijiensis*, se ha reportado que la juglona actúa a

nivel de cloroplasto, interfiriendo en el gradiente electroquímico de protones que atraviesa la membrana plasmática e incrementa la pérdida de electrolitos (Lepoivre *et al.*, 2002). También, recientemente se demostró que en variedades de banano parcialmente resistentes a la Sigatoka negra (e.g. Fougamou), la juglona provoca una producción temprana de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una rápida estimulación de un sistema antioxidante, el cual disminuye los daños al tejido vegetal, en tanto que en variedades altamente susceptibles (e.g. Enano Gigante), la generación de ROS es tardía, lo que ocasiona una lenta estimulación del sistema antioxidante, un desbalance entre la generación de ROS, y su eliminación por los sistemas antioxidantes de la planta observándose daño al tejido vegetal (El Hadrami *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que la juglona es un metabolito que ha sido aislado de plantas (e.g. *Juglans* spp.) y ampliamente estudiado por su efecto alelopático (Sun *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha reportado que la juglona tiene capacidad para interferir con la toma de oxígeno de la raíz, para disminuir la actividad ATPasa-H<sup>+</sup>, para inhibir el desarrollo de larvas de insectos y con efectos sedantes en animales, además de poseer actividad mutagénica, carcinogénica, antimicrobiana, antifúngica y antiparasitaria (Hejl & Koster, 2004).

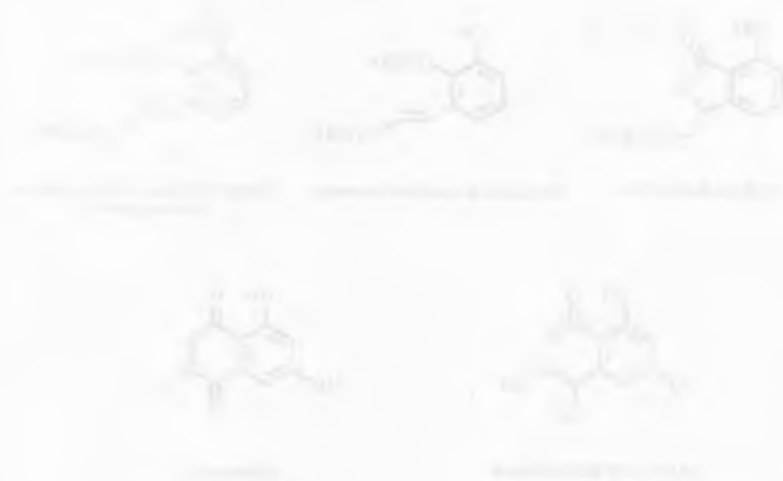


**Figura 1.8.** Fitotoxinas aisladas del extracto lipofílico de *M. fijiensis*.

Aún cuando el número reportado de fitotoxinas lipofílicas producidas por *M. fijiensis* es limitado, hasta ahora no se han identificado fitotoxinas de naturaleza hidrofílica producidas por este fitopatógeno. No obstante, en estudios previos, se reportó la presencia de actividad fitotóxica tanto en el extracto orgánico como la fase acuosa residual, obtenidos a partir de filtrados *M. fijiensis* cultivado en medio de jugo V-8. Lo anterior indica la producción de dos grupos de metabolitos fitotóxicos por parte de *M. fijiensis*, uno de naturaleza lipofílica y otra de naturaleza hidrofílica (Puch-Ceh, 2001); estos resultados no coinciden con los reportados por Stierle *et al.* (1991), quienes no encontraron evidencia de fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis* cultivado en el medio sintético MD-1. Adicionalmente, mientras que Stierle *et al.* (1991) reportaron que los cultivos de *M. fijiensis* en medio sintético MD-1 producen un alto rendimiento de fracción lipofílica; en contraste, el cultivo del patógeno en medio V-8 produjo

una fracción lipofílica con bajo rendimiento y actividad fitotóxica moderada (Puch-Ceh, 2001).

Como parte del interés en el estudio de los metabolitos fitotóxicos producidos por *M. fijiensis* y el papel que éstos juegan durante la interacción *M. fijiensis*-*Musa* spp., para el presente trabajo se planteó llevar a cabo la detección, aislamiento e identificación de fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis*, además de evaluar su selectividad y su posible sitio de acción.



El presente trabajo forma parte de un estudio más amplio sobre la interacción entre *M. fijiensis* y *Musa* spp. El objetivo principal es identificar y caracterizar los metabolitos fitotóxicos hidrofílicos producidos por *M. fijiensis*. Para ello se realizó un aislamiento y purificación de los extractos de la planta parásita, seguida de una serie de análisis químicos y biológicos. Los resultados obtenidos indican que se trata de compuestos con actividad fitotóxica moderada, capaces de afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedadoras. Se espera que estos hallazgos contribuyan a comprender mejor la interacción entre *M. fijiensis* y *Musa* spp., y a desarrollar estrategias de control más efectivas.

## **1.4 HIPÓTESIS**

La presencia de actividad fitotóxica en el filtrado acuoso del cultivo de *M. fijiensis* sugiere que este fitopatógeno produce fitotoxinas de naturaleza hidrofílica.

## **1.5 OBJETIVOS**

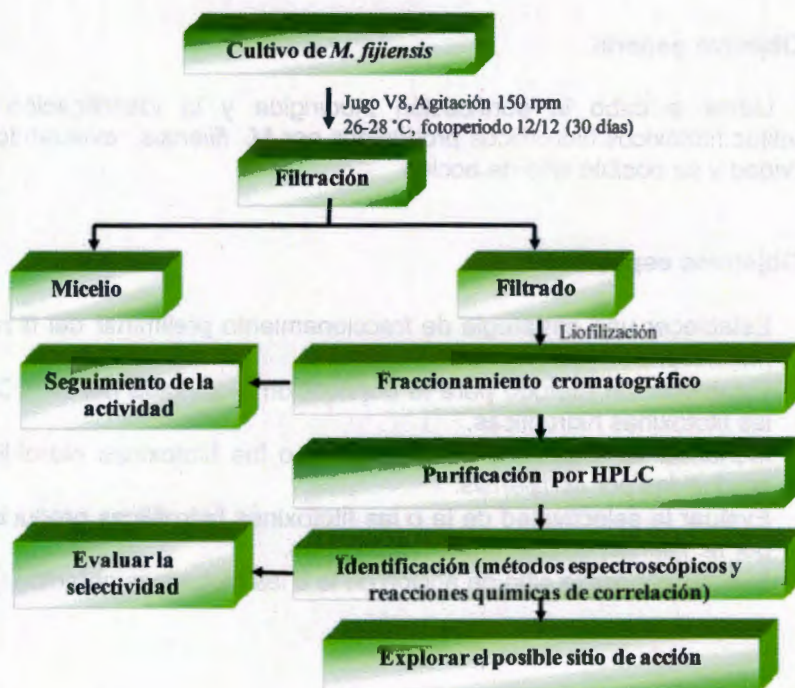
### **1.5.1 Objetivo general**

Llevar a cabo la purificación biodirigida y la identificación de metabolitos fitotóxicos hidrofílicos producidos por *M. fijiensis*, evaluando su selectividad y su posible sitio de acción.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Establecer una estrategia de fraccionamiento preliminar del filtrado fitotóxico.
- Establecer un método para la purificación biodirigida por HPLC de las fitotoxinas hidrofílicas.
- Identificar la estructura química de la o las fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis*.
- Evaluar la selectividad de la o las fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis* en diferentes hospederos.
- Evaluar el posible sitio de acción de la o las fitotoxinas obtenidas.

## 1.6 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL





## 1.7 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H. K., T. Tanaka., S. O. Duke., J. K. Porter., E. M. Wray., L. Hodges., A. E. Sessions., E. Wang., A. H. Jr. Merrill and R. T. Riley (1994). *Fumonisin and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases*. Plant Physiology, 106, 1085-1093.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp. 175-248.
- Akimitsu, K., K. Kohmoto., H. Otani and S. Nishimura (1989). *Host-specific effects of toxin from the rouge lemon pathotype of Alternaria alternata on mitochondria*. Plant Physiology, 89, 925-931.
- Alfano, J. R. and A. Collmer (2004). *Type III secretion System Effector Proteins: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense*. Annual Review of Phytopathology, 42, 385-414.
- Au, T. K., W. S. H. Chick and P. C. Leung (2000). *Initial kinetics of the inactivation of calmodulin by the fungal toxin ophiobolin A*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 32, 1173-1182.
- Ballio, A. (1991). *Non-host-selective fungal phytotoxins: Biochemical aspects of their mode of action*. Experientia, 47, 783-790.
- Bayer Crop Science. (2005). "Sigatoka negra". Retrieved October 15, 2009 from [http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/id/SigatokaDiseases\\_BCS](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/id/SigatokaDiseases_BCS)
- Brosch, G., R. Ransom., T. Lechner., J. D. Walton and P. Loidl (1995). *Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin of Cochliobolus carbonum*. The plant Cell, 7, 1941-1950.
- Carlier, J., M. H. Lebrun., M. F. Zapater., C. Dubois and X. Mourichon (1996). *Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, Mycosphaerella fijiensis*. Molecular Ecology, 5, 499-510.

- Ciardi, J. A., D. M. Tieman., S. T. Lund., J. B. Jones., R. E. Stall and H. J. Klee (2000). *Response to Xanthomonas campestris pv. vesicatoria in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression*. Plant Physiology, 123, 81-92.
- Crouch, J. H., D. Vuylsteke and R. Ortiz (1998). *Perspectiva on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (Musa ssp.)*. Electronic Journal of Biotechnology, 1, 1-12.
- Daub, M. E. (1982). *Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin*. Plant Physiology, 69, 1361-1364.
- Dewey, R. E., J. N. Siedow., D. H. Timothy and C. S. III. Levings (1988). *A 13-kilodalton maize mitochondrial protein in E. coli confers sensitivity to Bipolaris maydis toxin*. Science, 239, 293-295.
- Douglas, M. and R. Ronald (1992). *El combate de la Sigatoka negra*. Boletín No. 4. Departamento de investigaciones, CORBANA, pp. 22.
- Driouich, A., A. Jauneau and L. A. Staehelin (1997). *7-Dehydrobrefeldin A, a naturally occurring brefeldin A derivative, inhibits secretion and causes a cis-to-trans breakdown of Golgi stacks in plant cells*. Plant Physiology, 113, 487-492.
- Driouich, A., G. F. Zhang and L. A. Staehelin (1993). *Effect of brefeldin A on the structure of the Golgi apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple (Acer pseudoplatanus) suspension-culture cells*. Plant Physiology, 101, 1363-1373.
- El Hadrami, A. E., D. Kone and P. Lepoivre (2005). *Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to black leaf streak disease*. European Journal of Plant Pathology, 113, 241-254.
- FAO (2003). *The world banana economy, 1985-2002*. Retrieved October 15, 2009 from <http://www.fao.org/docrep/007/y5102e/y5102e03.htm#bm03>.
- Flor, H. H. (1971). *Currents status of the gene-for-gene concept*. Annual Review of Phytopathology, 9, 275-296.

- Fouré, E. (1982). *Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains a Mycosphaerella fijiensis au Gabon (Y)*. Fruits, 37, 759-770.
- Fullerton, R. A. and T. L. Olsen (1995). *Pathogenic variability in Mycosphaerella fijiensis Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain*. New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science, 23, 39-48.
- Ganry, J. (1993). *Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests*. Cirad-Inibap, Montpellier, France, pp. 193-199.
- Gilchrist, D. G. (1983). "Molecular modes of action", in *Toxins and plant pathogenesis*, Daly, J. M. and B. J. Deverall (eds). Academic Press, Sydney. pp. 81-136.
- Gilchrist, D. G., H. Wang and R. M. Bostock (1995). *Sphingosine-related mycotoxins in plant and animal diseases*. Canadian Journal of Botany, 73, S459-S467.
- Glazebrook, J. (2005). *Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens*. Annual Review of Phytopathology, 43, 205-227.
- Gomés, E., F. Simon-Plas., M. L. Milat., I. Gapillout., V. Mikes., A. Pugin and J. P. Blein (1996). *Cercospora beticola toxins. IX Relationship between structure of beticolins, inhibition of plasma membrana H<sup>+</sup>-ATPase and partition in lipid membranes*. Physiologia Plantarum, 98, 133-139.
- González, L. C. (1975). *Introducción a la fitopatología*. IICA, San José, Costa Rica. pp.148.
- Hammond-Kosack, K. and J. D. G. Jones (2000). "Responses to Plant Pathogens", in *Biochemistry and molecular biology of plants*, Buchanan, B. B., W. Gruissem., R. L. Jones (eds). American society of plant physiologists, USA. pp. 1102-1156.
- Harelimana, G., P. Lepoivre., H. Jijakli and X. Mourichon (1997). *Use of Mycosphaerella fijiensis toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak*. Euphytica, 96, 125-128.
- Hayden, H. L., J. Carlier and E. A. B. Aitket (2003). *Genetic structure of Mycosphaerella fijiensis populations from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands*. Plant Pathology, 52(6), 703-712.

- Hejl, A. M. and K. L. Koster (2004). *Juglone disrupts root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (Glycine max) and Corn (Zea mays)*. Journal of Chemical Ecology, 30(2), 453-471.
- Herrera, T. y M. Ulloa (1998). *El reino de los hongos. Micología básica y aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V. pp. 375-377.
- Hoss, R., J. Helbig and H. Bochow (2000). *Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (Musa spp.-Mycosphaerella fijiensis)*. Journal of Phytopathology, 148, 387-394.
- Idnurm, A. and B. J. Howlett (2001). *Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi*. Molecular Plant Pathology, 2(4), 241-255.
- Jackson, A. and C. Taylor (1996). *Plant-Microbe Interactions: Life and death at the interface*. The Plant Cell, 8, 1651-1668.
- Jeng-Sheng, H. (2001). *Plant Pathogenesis and resistance: Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 292-383.
- Johansson, F., M. Sommarin and C. Larsson (1993). *Fusicoccin activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by mechanism involving the C-terminal inhibitory domain*. The Plant Cell, 5, 321-327.
- Jones, D. R. (2000). *Diseases of banana, abaca and ensent*. Cab Publishing, New York. pp. 1-4, 37, 72-75.
- Keen, N. T. (1990). *Gene-for-Gen Complementarity in Plant-Pathogen Interactions*. Annual Review of Genetics, 24, 447-463.
- Knoche, H. and J. P. Duvick (1987). "The role of fungal toxins in plant disease", in *Fungal Infection of Plants. Symposium of the British Mycological Society*. Pegg G. F. and P. G. Ayres (eds). Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney. pp. 158-192.
- Knogge W. (1996). *Fungal Infection of Plants*. The Plant Cell, 8, 1711-1722.
- Kohmoto, K. and H. Otani (1991). *Host recognition by toxigenic plant pathogens*. Experientia, 47, 755-764.

- Kohmoto, K., H. Otani and S. Nishimura (1987). "Primary action sites for host-specific toxins produced by *Alternaria species*" in *Molecular determinants of plant diseases*. Nishimura, S., C. P. Vance., N. Doke (eds). Japan Sci Soc Press/Springer, Tokyo. pp. 127-143.
- Lee, S. S., K. Kawakita., T. Tsuge and N. Doke (1992). *Stimulation of phospholipase A<sub>2</sub> activity in strawberry cells treated with AF-toxin I produced by Alternaria alternate strawberry pathotype*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 41, 283-294.
- Lepoivre, P., J. P. Busogoro., A. El Hadrami., J. Carlier., G. Harelimana., X. Mourichon., B. Panis., A. Stella-Riveros., N. Roux., G. Sallé., H. Strosse and R. Swennen (2002). "Banana-*Mycosphaerella fijiensis* (black leaf streak disease) interactions" in *Proceeding of the Second International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas*, INIBAP San José, Costa Rica. pp. 20-23.
- Leung, P. C., W. A. Taylor., J. H. Wang and C. L. Tipton (1985). *Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin A*. *Plant Physiology*, 77, 303-308.
- Macri, F., P. Dell' Antone and A. Vianello (1983). *ATP-dependent proton uptake inhibited by Cercospora beticola toxin in pea stem microsomal vesicles*. *Plant, Cell & Environment*, 6, 555-558.
- Manzo, G., M. Orozco and S. Guzmán (2001). *Caracterización morfológica de Mycosphaerella fijiensis Morelet de la región pacífico-centro de México y su desarrollo en medios líquidos*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1), 66-71.
- Marín D. H., R. A. Romero., M. Guzmán and T. B. Sutton (2003). *Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation*. *Plant Disease*, 87, 208-220.
- Markham, J. E. and J. Hille (2001). *Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions*. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 229-239.
- Martin, G. B., A. J. Bogdanove and G. Sessa (2003). *Understanding the functions on plant disease resistance proteins*. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 23-61.

- Meredith, D. S. and J. S. Lawrence (1969). *Black leaf streak disease (Mycosphaerella fijiensis): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus*. Transactions of the British Mycological Society, 53, 459-476.
- Mitchell, R. E. (1984). *The relevance of non-host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens*. Annual Review of Phytopathology, 22, 215-245.
- Miyashita, M., T. Nakamori., H. Miyagawa., M. Akamatsu and T. Ueno (2003). *Inhibitory activity of analogs of AM-Toxin, a Host-specific phytotoxin from Alternaria alternata apple pathotype, on photosynthetic O<sub>2</sub> evolution in apple leaves*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 67(3), 635-638.
- Mohan, S. and R. Swennen (2004). *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*. Science Publisher, United States of America. pp. 341-349.
- Molina, G. C. and J. P. Krausz (1989). *A phytotoxic activity in extracts of broth culture of Mycosphaerella fijiensis Morelet var. difformis and its use to evaluated host resistance to black Sigatoka*. Plant Disease, 73, 142-143.
- Muroi, M., N. Shiragami and A. Takatsuki (1994). *Destruxin B, a specific and readily reversible inhibitor of vacuole-type H<sup>+</sup>-translocating ATPase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 205, 1358-1365.
- Nishimura, S. and K. Kohmoto (1983). *Host-specific toxins and chemical structures from Alternaria species*. Annual Review of Phytopathology, 21, 87-116.
- Okole, B. N. and F. A. Schulz (1997). *Selection of Mycosphaerella fijiensis-resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain*. Plant Cell Reports, 16, 339-343.
- Orozco-Santos, M., J. Orozco-Romero (2004). *La Sigatoka negra en bananos y platanos: El caso de México*. XVI Reunión Internacional ACORBAT, pp. 70-78.

- Orozco-Santos, M., J. Orozco-Romero., J. Velásquez-Monreal., G. Manzo Sánchez y S. Guzmán-Gonzalés (2004). *Enfermedades de bananos y plátanos (Musa spp.) en México*. XVI Reunión Internacional ACORBAT, pp. 212-213.
- Otani, H., K. Kohmoto and M. Kodama (1995). *Alternaria toxins and their effects on host plant*. Canadian Journal of Botany, 73, S453-S458.
- Prell, H. H. and P. R. Day (2000). *Plant-Fungal Pathogen Interaction: A Classical and Molecular View*. Springer, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapore, Tokio. pp. 57-64.
- Puch-Ceh, M. A. (2001). *Evaluación de la actividad fitotóxica en cultivos de Mycosphaerella fijiensis Morelet mediante el uso de diferentes técnicas de bioensayo*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. pp. 37-40, 57-58, 61-64.
- Rhodes, P. L. (1964). *A new Banana disease in Fiji*. Commonwealth Phytopathological News. 10: 38-41.
- Robinson, J. C. (1996). *Bananas and plantains*. University Press Cambridge, UK, pp. 1-3.
- Rudolph, K. (1976). "Non-specific toxins", in *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series 4: Physiological Plant Pathology*, Heitefuss, R. and P. H. Williams (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 270-315.
- Sánchez, M. y W. Cárdenas (2002). *Producción de anticuerpos policlonales contra el hongo causante de la Sigatoka negra, Mycosphaerella fijiensis*. Revista Tecnológica, 15(1), 55-61.
- Scheffer, R. P. and R. S. Livigngton (1984). *Host-selective toxins and their role in plant diseases*. Science, 223, 17-21.
- Schröter, H., A. Novacky and V. Macko (1985). *Effect of Helminthosporium sacchari-toxin on cell membrane potential susceptible sugarcane*. Physiological Plant Pathology, 26, 165-174.
- Sotto, R. C., and R. C. Rabara (2000). *Diversidad morfológica de Musa balbisiana Colla en Filipinas*. Infomusa, 9(2), 28-30.

- Stierle, A. A., R. Upadhyay., J. Hershenhorn., G. A. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains*. *Experientia*, 47, 853-858.
- Stover, R. H. (1980). *Sigatoka leaf spot of bananas and plantains*. *Plant Disease*, 64, 750-756.
- Strobel, G., D. Kenfield., G. Bunkers., F. Sugawara and J. Clardy (1991). *Phytotoxins as potencial herbicides*. *Experientia*, 47, 819-827.
- Sun, M. L., Y. M. Wang., Z. Q. Song and G. Z. Fang (2007). *Insecticidal activities and active components of the alcohol extract from green peel of Juglans mandshurica*. *Journal of Forestry Research*, 18(1), 62-64.
- Telles-Pupulin, A. R., S. P. S. S. Diniz., A. Bracht and E. L. Ishii-Iwamoto (1996). *Effects of fusaric acid on respiration in maiz root mitochondria*. *Biologia Plantarum*, 38, 421-429.
- Upadhyay, R. K., G. A. Strobel., S. J. Coval and J. Clardy (1990). *Fijiensin, the first phytotoxin from M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease*. *Experientia*, 47, 982-984.
- VanEtten, H. D., J. W. Mansfield, J. A. Bailey and E. E. Farmer (1994). *Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins"*. *The Plant Cell*, 6, 1191-1192.
- Vargas, D. M. and R. Romero (1998). *Divulgación científica al servicio del productor bananero nacional*. Corporación bananera nacional, San José, Costa Rica, pp. 104-129.
- Walton, J. D. (1996). *Host-Selective toxins: Agents of compatibility*. *The Plant Cell*, 8, 1723-1733.
- Wang, E., W. P. Norred., C. W. Bacon., R. T. Riley and A. H. Jr. Merrill (1991). *Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with Fusarium moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 14486-14490.
- Wolpert, T. J. and V. Macko (1989). *Specific binding of victorin C, the major host-selective toxin from Cochliobolus victoriae*. *Experientia*, 41, 1524-1529.



Wolpert, T. J., L. D. Dunkle., L. M. Ciuffetti (2002). *Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name?* Annual Review of Phytopathology, 40, 251–285.



## CAPÍTULO 2

### Purificación biodirigida de las fitotoxinas hidrofílicas de *M. fijiensis*

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

Una vez que se sospecha que una fitotoxina está involucrada en la enfermedad de una planta, la subsecuente investigación depende de métodos confiables para la producción, detección y purificación biodirigida del o los metabolitos fitotóxicos. Debido a que las fitotoxinas son productos del metabolismo microbiano, las técnicas utilizadas para su producción y aislamiento no son diferentes a las de la mayor parte de aquellas utilizadas para otros productos microbianos como antibióticos, vitaminas y enzimas (Shaw, 1981).

Las fitotoxinas son usualmente producidas y aisladas de un cultivo *in vitro* del patógeno, cultivado frecuentemente en medio líquido; la composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento son determinantes para la producción de los metabolitos fitotóxicos de interés (Shaw, 1981; Strange, 2007). Después de remover el organismo toxigénico, las fitotoxinas pueden ser extraídas de las soluciones acuosas por partición con un solvente orgánico (e.g. ofiobolina A, toxinas AM, cercosporina, etc.) o por extracción en fase sólida (e.g. rizobitoxina, siringomicina, tabtoxina, etc.) (Shaw, 1981). No obstante, la purificación comúnmente se lleva a cabo mediante la combinación de diversas técnicas cromatográficas, dependiendo de la polaridad de los metabolitos a separar o de su naturaleza lipofílica o hidrofílica.

La purificación de productos naturales hidrofílicos representa el mayor reto en la ciencia de separación (Hostettmann *et al.*, 1985); muchos productos hidrofílicos (e.g. polisacáridos, péptidos, saponinas, etc.) presentan actividades biológicas únicas y de gran interés para el hombre, por lo cual es esencial contar con técnicas o estrategias sencillas, que permitan su purificación. Algunas técnicas utilizadas en el aislamiento y purificación de metabolitos hidrofílicos son la cromatografía en columna de fase reversa (e.g. C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>), la extracción en fase sólida (e.g. resinas inertes como Diaion HP-20<sup>®</sup> o de intercambio iónico como Amberlite XAD-2<sup>®</sup>), la cromatografía de permeación en gel (e.g. Sephadex LH-20<sup>®</sup>) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Shimizu, 1998).

En la cromatografía en columna de fase reversa el adsorbente tradicional de sílice está unido a cadenas alifáticas (e.g. C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>), las cuales le confieren características lipofílicas que permiten la separación de componentes polares. Por otra parte, la extracción en fase sólida utilizando la resina Diaion HP-20<sup>®</sup>, una resina de naturaleza hidrofóbica constituida por estructuras poliméricas de estireno, permite la separación de componentes polares por retención de productos lipofílicos, en tanto que la extracción en fase sólida utilizando la resina de intercambio iónico Amberlite XAD-2<sup>®</sup> permite la separación de biomoléculas con base en sus características de carga. Para la purificación de productos hidrofílicos por cromatografía de permeación en gel se utiliza comúnmente la resina Sephadex LH-20<sup>®</sup>; en este tipo de cromatografía líquida la resina está constituida por polímeros entrecruzados de azúcares hidroxipropilados, lo que permite llevar a cabo separaciones por exclusión molecular. Finalmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite purificaciones bajo condiciones de alta presión y con mayor resolución (Meyer, 1994; Salituro & Dufresne, 1998).

Existen un número importante de reportes sobre diferentes estrategias para el fraccionamiento preliminar y la purificación de metabolitos hidrofílicos, particularmente saponinas, un grupo de metabolitos hidrofílicos de interés biológico, farmacéutico y comercial (Aquino *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1995; Sung *et al.*, 1995; Osbourn, 1996; Zhang, 1999). Estas estrategias incluyen la extracción en fase sólida con resina Diaion HP-20<sup>®</sup> (Seo *et al.*, 2002) y Amberlite XAD-2<sup>®</sup> (Yang *et al.*, 2003); la cromatografía de permeación en gel Sephadex LH-20<sup>®</sup> (Cioffi, *et al.*, 2006); la cromatografía en columna de gel de sílice de fase reversa C<sub>18</sub> (Matsushita *et al.*, 2004a y b) y HPLC (Sánchez-Medina *et al.*, 2009). Sin embargo, en la literatura existen escasos reportes sobre la purificación de metabolitos fitotóxicos hidrofílicos producidos por hongos fitopatógenos. Para el caso de especies del género *Alternaria*, únicamente se ha reportado dos productos hidrofílicos, la ferricrocina y el coprogeno (Ohra *et al.*, 1995), en tanto que para el caso particular de *M. fijiensis*, hasta ahora no se ha reportado ningún metabolito fitotóxico de naturaleza hidrofílica.

Con base en lo anterior, en la primera parte de este capítulo (sección 2.2) se incluye una copia de la publicación que describe el establecimiento de una estrategia para el fraccionamiento preliminar del filtrado fitotóxico de *M. fijiensis* y la purificación biodirigida por HPLC de las fitotoxinas hidrofílicas; posteriormente, en la segunda parte del capítulo (sección 2.3) se describe una estrategia alterna para la purificación de los metabolitos fitotóxicos hidrofílicos de *M. fijiensis*.

## 2.2 PRODUCTION OF HYDROPHILIC PHYTOTOXINS BY *Mycosphaerella fijiensis*<sup>§</sup>

Carlos A. Cruz-Cruz, Karolina García-Sosa, Fabiola Escalante-Erosa and Luis M. Peña-Rodríguez

### 2.2.1 Abstract

We have established a reproducible strategy to purify hydrophilic phytotoxins present in the aqueous filtrate of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. The lyophilized culture filtrate is initially treated with activated charcoal, then successively purified using vacuum liquid chromatography and semipreparative high performance liquid chromatography. Phytotoxic activity was tested using a leaf-spot assay on healthy banana leaves.

**Key words:** Phytotoxins, *Mycosphaerella fijiensis*, Bananas, Leaf-spot assay, black Sigatoka.

<sup>§</sup>Este capítulo ha sido publicado en *Journal of General Plant Pathology*, (2009) 75(3), 191-195.

---

\* corresponding author; Tel.: +52-999-9428330 ext. 159; Fax: +52-999-9813900; e-mail: [lmanuel@cicy.mx](mailto:lmanuel@cicy.mx)

### 2.2.2 Introduction

Phytotoxins are defined as low molecular weight, secondary metabolites produced by phytopathogens that may cause necrosis, chlorosis, wilting, or a combination of these symptoms in susceptible plant hosts (Knoche & Duvick, 1987; Prell & Day, 2000; Huang, 2001). These metabolites have been classified according to their role in the infectious process as host selective toxins (HSTs) or non-host selective toxins (non-HSTs) (Ballio & Graniti, 1991; Knogge, 1996; Walton, 1996; Wolpert *et al.*, 2002).

HSTs are considered as primary determinants of pathogenicity because their production is required for the pathogen to colonize the plant. Furthermore, these metabolites can induce the symptoms of the disease even in absence of the pathogen and are toxic only to hosts of the pathogen that produces them (Walton, 1996; Markham & Hille, 2001; Wolpert *et al.*, 2002). On the other hand, non-HSTs are not essential for the infection, but they contribute to the virulence of the pathogen and are thus recognized as secondary determinants of pathogenicity; these metabolites can affect a wider or different range of hosts, causing a variety of symptoms (Mitchell, 1984; Ballio & Graniti, 1991; Knogge, 1996). Phytotoxins can exert their effects by inhibiting specific enzymes or by interfering with membrane functions or defense responses (Strange, 2007). Potential applications of phytotoxins include their use as probes for studying the molecular basis of disease resistance and susceptibility in plants, as tools for the *in vitro* screening and breeding of disease resistant plants, and as natural alternatives to herbicides in weed control (Strobel *et al.*, 1991; Harelimana *et al.*, 1997; Okole & Schulz, 1997; Berestetskiy, 2008).

The hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* is recognized as the causal agent of black Sigatoka, the most destructive and devastating disease of bananas and plantains in nearly all banana-growing regions of the world (Carlier *et al.*, 2000). The disease significantly decreases banana production by premature ripening of the fruits and lower photosynthetic activity from a reduction in leaf area (Sánchez & Cárdenas, 2002). The symptoms of the disease include elongated, necrotic lesions surrounded by chlorotic zones, suggesting the involvement of phytotoxins (Upadhyay *et al.*, 1990).

Even though a number of lipophilic phytotoxins have been reported from the organic extract of *M. fijiensis*, (Upadhyay *et al.*, 1990; Stierle *et al.*, 1991; Hoss *et al.*, 2000;), to date no hydrophilic phytotoxins have been identified from this pathogen. Recently, phytotoxic activity was detected, using the leaf-spot assay on banana leaves, in both the organic extract and

the aqueous residual phase obtained after the ethylacetate extraction of culture filtrates of *M. fijiensis* grown in V-8 juice medium. The differing solubilities indicated the production of two groups of phytotoxic metabolites by *M. fijiensis*, one lipophilic and the other of hydrophilic nature (Puch-Ceh, 2001). These results did not agree with those reported by Stierle *et al.*, (1991), who found no evidence of hydrophilic phytotoxins produced by *M. fijiensis* in M-1-D medium. Furthermore, while Stierle *et al.*, (1991) reported that the phytopathogen produces a high yield of lipophilic fraction when cultured in M-1-D medium; culturing of *M. fijiensis* in V-8 juice medium results in a lipophilic fraction that is low in yield (21.3 mg/l) and moderately active (Puch-Ceh, 2001). As part of our interest in the phytotoxic metabolites produced by *M. fijiensis* and the study of their role in the infectious process, we describe here the production of hydrophilic phytotoxins by *M. fijiensis*.

### 2.2.3 Materials and methods

Technical-grade solvents, distilled in the laboratory, together with analytical (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de México, México) and high performance liquid chromatography (HPLC) grade (J.T. Baker) solvents were used in the various extraction and purification procedures. Solvents were evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator (Büchi, Postfach, Flawil, Switzerland, model 111) equipped with a water bath (Büchi, model 461), which was kept at 40°C. Aqueous fractions were lyophilized using a LABCONCO freeze dryer model 7753020 (Kansas City, USA). Vacuum liquid chromatography (VLC) and column chromatography purifications were carried out using TLC-grade E.M. Merck (Darmstadt, Germany) silica gel 60GF and Aldrich (Milwaukee, WI, USA) silica gel (70–230 mesh), respectively.

The different fractions were monitored by analytical HPLC using a Waters 600 series system (Milford, MA, USA), equipped with a Waters 2487 UV/Vis detector and a Waters 600E controller loaded with the program Millennium. Separations were carried out using a Waters C18 Spherisorb analytical column (5 µm ODS2; 4.6 mm inner diameter, 250 mm long) and a 10:90 mixture of CH<sub>3</sub>CN:buffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM, pH 2.5 adjusted with perchloric acid) as the mobile phase; with a flow rate of 0.3 ml/min and the detector set at both 240 and 260 nm. Phytotoxic fractions were purified by semipreparative HPLC using a Hypersyl C18 (Alltech, Deerfield, IL, USA) preparative column (120 8U; 10 mm inner diameter, 250 mm long), and the same 10:90 mixture of CH<sub>3</sub>CN:buffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM, pH 2.5 adjusted with perchloric acid) as the mobile phase, with a flow rate of 0.6 ml/min, monitoring at 240 and 260 nm.

The strain of *M. fijiensis* (C-1233) was kindly donated by Dr. Jean Carlier (CIRAD, France). The banana plant material (corms and buds of *Musa acuminata* cv. Grande naine) used for establishing *in vitro* cultures was provided by Alberto Mayo (UJAT, Villermosa, Tabasco, México).

Cultures of the fungus were grown in 500 ml flasks containing 200 ml of V-8 juice (Herdez, México, DF, México) medium with 2 g CaCO<sub>3</sub>/l. The pH of the medium was adjusted to 5.5 with 1 N HCl prior to sterilization. Each flask was inoculated with 1 ml of an aqueous suspension of fresh mycelium and conidia, then incubated in an orbital shaker at 150 rpm (New Brunswick Scientific, Orbital Shaker Model G25), at 26 ± 2 °C, for 30 days, under photoperiod (12 h light/12 h dark) conditions. After the incubation period, the culture broth was separated from the mycelial mat by filtration through two layers of gauze and paper towels, and the volume of the filtrate was concentrated *in vacuo* to 1/10 of its original volume. The resulting concentrated filtrate was then lyophilized.

The phytotoxic activity of the filtrate and the different purified fractions was evaluated using a leaf-spot assay on healthy leaves of banana plants (*M. acuminata* cv. Grande naine) growing in pots under greenhouse conditions. The first or second youngest leaf of a 4-month-old banana plant was excised, then disinfected for 60 s using a 5% solution of commercial sodium hypochlorite (Clorox, Tlalnepantla, Edo. de México, México). The leaves were rinsed with sterile distilled water, dried between two paper towels and placed in a plastic container, previously disinfected with 70% ethanol, lined with five wet paper towels.

A 20 µl drop of the filtrate or different fractions (2 or 3% solution) was placed on a wound made with a scalpel in the adaxial face of the leaf. Two leaves were used for each treatment, and the container was kept at room temperature under natural light conditions. The phytotoxic effects (i.e., total damaged area, including necrosis and chlorosis) were registered at 72 h after treatment; the lesion area was calculated using a leaf area measurer (Li-3100; Li-Cor, Lincoln; Nebraska, USA). Both sterile uninoculated medium and water were used as controls. All evaluations were done in duplicate.

The lyophilized crude filtrate (**A**, 10 g) was resuspended in water (1:50 lyophilized filtrate to water) and treated with activated charcoal (1:5 lyophilized filtrate to activated charcoal). The resulting suspension was left to stir slowly overnight at 40 °C, and then filtered. The clarified filtrate was concentrated to 1/10 of its original volume and then lyophilized to produce a pigment-free fraction **B** (7.1 g, 71%). Extraction (methanol) of the residual activated charcoal yielded 0.2 g (2%) of fraction **C**.

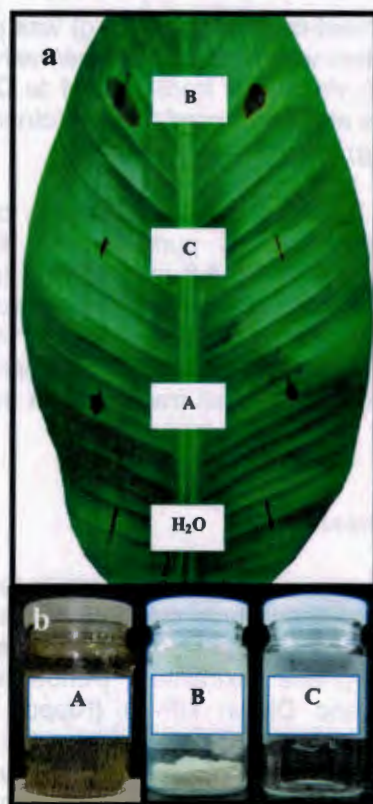


A portion of pigment-free fraction **B** (1 g) was purified by VLC using a stepwise gradient elution with dichloromethane/methanol/water (14:7:1 to 10:10:1) mixtures, which yielded 12 fractions (**D1** to **D12**). Leaf-spot assay evaluation of all fractions at 3% indicated that phytotoxic activity was located in fractions **D5** (167.8 mg) and **D6** (138.6 mg).

The phytotoxic fractions **D5** and **D6** were combined to produce fraction **E**. Semipreparative HPLC purification of fraction **E** (250 mg) produced fractions **F3** (peak at  $t_R$  18.8 min) and **F4** (peak at  $t_R$  28.9 min), which were lyophilized and then desalted by column chromatography (isocratic elution, dichloromethane/methanol/water 14:7:0.5), to yield the corresponding fractions **G** (2.2 mg) and **H** (1.5 mg), each a major component in HPLC. The phytotoxic activity of all fractions was evaluated at 2% using the leaf-spot assay.

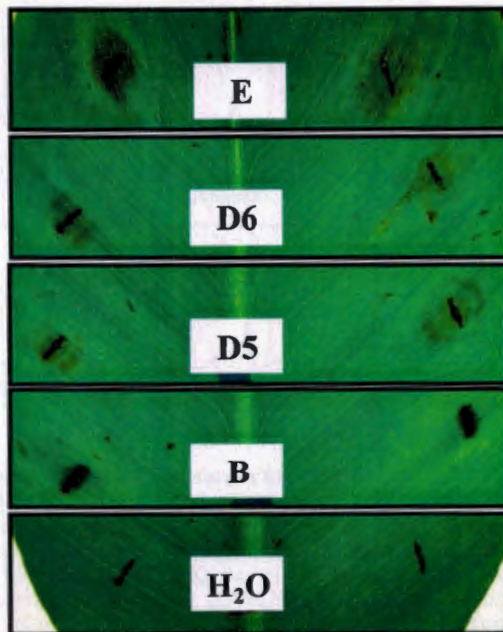
#### 2.2.4 Results and discussion

It is important to mention that initial attempts to purify the hydrophilic phytotoxins from the lyophilized crude culture filtrate of *M. fijiensis* using a number of different chromatographic techniques and fractionation procedures, e.g. solid-phase extraction [Amberlite XAD-2 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and Diaion HP-20 (Nippon Rensui, Kanagawa, Japan)], reverse-phase (C18) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) chromatography, and gel filtration chromatography (Sephadex LH-20, Uppsala, Sweden), were hampered by the pigments in the lyophilized crude filtrate. However, treatment of the lyophilized crude filtrate (**A**) with activated charcoal produced a pigment-free fraction (**B**), which caused more phytotoxic damage than did the original lyophilized crude filtrate (**A**) (Fig. 2.1a). This finding suggests that the hydrophilic phytotoxins produced by *M. fijiensis* and present in the pigment-free fraction **B** (Fig. 2.1b), are different than those previously identified and reported as melanin shunt pathway metabolites (Stierle *et al.*, 1991).

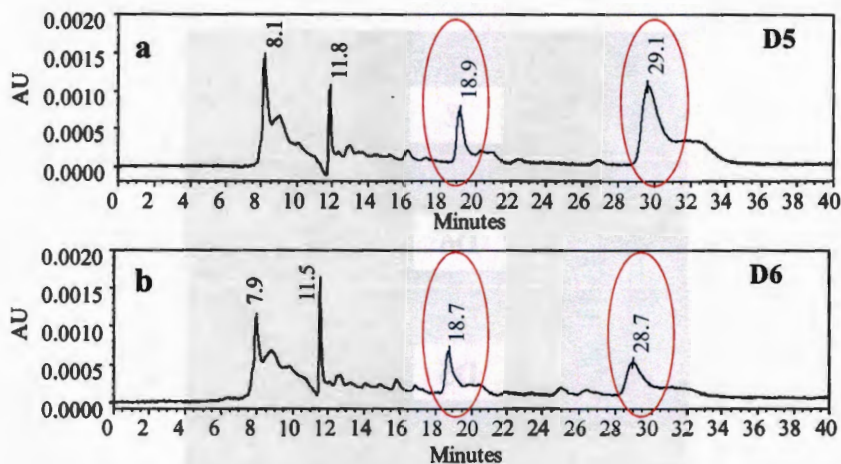


**Figure 2.1.** Phytotoxic damage on banana leaf caused by the crude filtrate of *Mycosphaerella fijiensis* (A) and the pigment-free fraction (B) tested at 3% (w:v). a The pigment-free fraction (B) caused more damage than did the original crude filtrate (A). Fraction C, from the methanol extraction of the residual activated charcoal, did not cause significant damage when tested at 3% on banana leaves. Both sterile uninoculated medium and water (H<sub>2</sub>O) were used as controls. Damaged tissue around the wound (necrosis and chlorosis) was quantified using a foliar area measurer (Li-COR, Lincoln; Nebraska, USA Li-3100). b Physical appearance (dark powder) of the lyophilized culture filtrate of *M. fijiensis* (A) before treatment with activated charcoal; lyophilized pigment-free fraction (B); and methanol extract of the residual activated charcoal (C).

Attempts to fractionate the pigment-free fraction B, using solid-phase extraction, reverse-phase, and gel filtration chromatography, were unsuccessful. However, VLC purification of fraction B resulted in the isolation of two semipurified fractions (D5 and D6) with phytotoxic activity when tested at 3% (w:v) (Fig. 2.2). The HPLC analysis of the two phytotoxic fractions showed the presence of two common components at  $t_R$  18.8 min and  $t_R$  28.9 min (Fig. 2.3a, b).

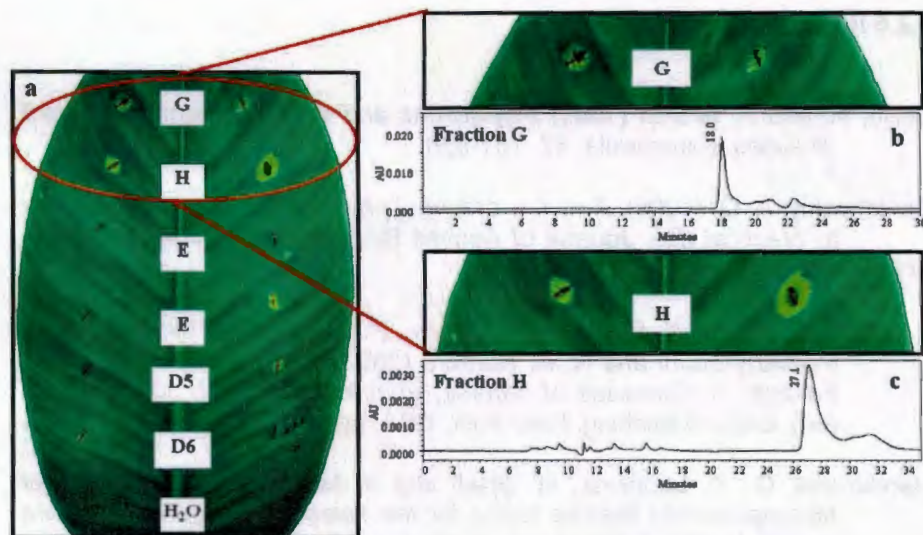


**Figure 2.2.** Phytotoxic damage of banana leaf caused by fractions **D5** and **D6**, obtained by vacuum liquid chromatography purification of fraction **B** from *Mycosphaerella fijiensis*. Fractions **D5** and **D6** were phytotoxic when tested at 3% (w/v) in the leaf-spot assay. Fraction **E**, resulting from the combination of fractions **D5** and **D6**, also was phytotoxic at 3% (w/v). Sterile uninoculated medium and water (H<sub>2</sub>O) were used as controls. Damaged tissue around the wound (necrosis and chlorosis) was quantified using a foliar area measurer (LI-COR, Lincoln; Nebraska, USA Li-3100).



**Figure 2.3.** Chromatographic profiles (HPLC) of phytotoxic fractions obtained by vacuum liquid chromatography of culture filtrate of *Mycosphaerella fijiensis*. **a** Fraction D5. **b** Fraction D6. In the HPLC chromatographic profile of both phytotoxic fractions there were two similar components at  $t_R$  18.8 min and  $t_R$  28.9 min. The fractions were analyzed by analytical HPLC on a Waters C18 Spherisorb analytical column (5  $\mu$ m ODS2; 4.6 mm inner diameter, 250 mm long), with a 10:90 mixture of CH<sub>3</sub>CN:buffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM, pH 2.5 adjusted with perchloric acid) as the mobile phase, with a flow rate of 0.3 ml/min, and the detector set at 240 and 260 nm.

Purification of the combined phytotoxic fractions D5 and D6 (to produce phytotoxic fraction E, Fig. 2.2) by semipreparative HPLC yielded two fractions, F3 ( $t_R$  18.8 min) and F4 ( $t_R$  28.9 min) which, after a desalting procedure by column chromatography, yielded fractions G and H, each showing a major component on HPLC (Fig. 2.4b, c), and both causing more phytotoxic damage than did the original fraction E, when tested at 2% (w:v) (Fig. 2.4a).



**Figure 2.4.** Phytotoxic damage of banana leaf caused by purified fractions from culture filtrate of *Mycosphaerella fijiensis* tested at 2% (w/v). **a** Fractions G and H caused more damage than did the original sample (E). Sterile uninoculated medium and water (H<sub>2</sub>O) were used as controls. **b** Chromatographic profile (HPLC) of fraction G. **c** Chromatographic profile (HPLC) of fraction H.

This report is the first on hydrophilic phytotoxins being produced by *M. fijiensis* and to present a simple strategy to purify them. Presently, we are isolating more of fractions G and H. The identification of the chemical structure of the purified metabolites will soon be published.

### 2.2.5 Acknowledgments

This investigation was supported by Project 2004-168 SAGARPA-CONACyT. The authors thank Cecilia Mónica Rodríguez-García and Leticia Peraza-Echeverría (UBT-CICY) for providing the certified strain of *M. fijiensis* (C-1233), Alberto Mayo-Mosqueda for establishing the *in vitro* cultures of banana plants, and Silvia Beatriz Andrade-Canto for technical assistance.

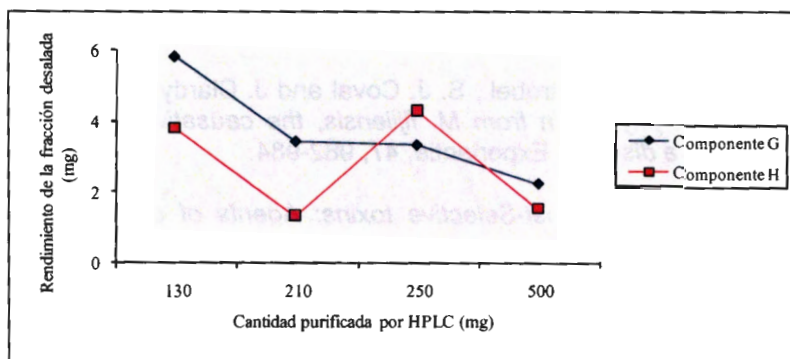
## 2.2.6 References

- Ballio, A. and A. Graniti (1991) *Phytotoxins and their involvement in plant diseases*. *Experientia*, 47, 751-826.
- Berestetskiy, A. O. (2008). *A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use*. *Journal of Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(5), 453-465.
- Carlier, J., E. Fouré., F. Gauhl., D. R. Jones., P. Lepoivre., X. Mourichon., C. Pasberg-Gauhl and R. A. Romero (2000). "Fungal Diseases of the Foliage", in *Diseases of banana, abacá and ensent*, Jones, D. R. (ed). CABI Publishing, New York, USA. pp. 1-4, 37, 72-75.
- Harelimana, G., P. Lepoivre., H. Jijakli and X. Mourichon (1997). *Use of Mycosphaerella fijiensis toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak*. *Euphytica*, 96, 125-128.
- Hoss, R., J. Helbig and H. Bochow (2000). *Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (Musa spp.-Mycosphaerella fijiensis)*. *Journal of Phytopathology*, 148, 387-394.
- Huang, J. S. (2001). *Plant pathogenesis and resistance: biochemistry and physiology of plant-microbe interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 292-383.
- Knoche, H. and J. P. Duvick (1987). "The role of fungal toxins in plant disease", in *Fungal Infection of Plants: Symposium of the British Mycological Society*, Pegg, G. F. and P. G. Ayres, (eds). Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney. pp. 158-192.
- Knogge, W. (1996). *Fungal Infection of Plants*. *The Plant Cell*, 8, 1711-1722.
- Markham, J. E. and J. Hille (2001). *Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions*. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 229-239.
- Mitchell, R. E. (1984). *The relevance of non-host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens*. *Annual Review of Phytopathology*, 22, 215-245.

- Okole, B. N. and F. A. Schulz (1997). *Selection of Mycosphaerella fijiensis-resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain*. Plant Cell Reports, 16, 339-343.
- Prell, H. H. and P. R. Day (2000). *Plant-Fungal Pathogen Interaction: A Classical and Molecular View*. Springer, Heidelberg; New York; Barcelona; Hong Kong; London; Milan; Paris; Singapore; Tokio. pp. 57-64.
- Puch-Ceh, M. A. (2001). *Evaluación de la actividad fitotóxica en cultivos de Mycosphaerella fijiensis Morelet mediante el uso de diferentes técnicas de bioensayo*. Masters thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. pp. 37-40, 57-58, 61-64.
- Sánchez, M. y W. Cárdenas (2002). *Producción de anticuerpos policlonales contra el hongo causante de la Sigatoka negra, Mycosphaerella fijiensis*. Revista Tecnológica, 15(1), 55-61.
- Stierle, A. A., R. Upadhyay., J. Hershenhorn., G. A. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains*. Experientia, 47, 853-858.
- Strange, R. N. (2007). *Phytotoxins produced by microbial plant pathogens*. Natural Product Reports, 24, 127-144.
- Strobel, G., D. Kenfield., G. Bunkers., F. Sugawara and J. Clardy (1991). *Phytotoxins as potencial herbicides*. Experientia, 47, 819-827.
- Upadhyay, R. K., G. A. Strobel., S. J. Coval and J. Clardy (1990). *Fijiensin, the first phytotoxin from M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease*. Experientia, 47, 982-984.
- Walton, J. D. (1996). *Host-Selective toxins: Agents of compatibility*. The Plant Cell, 8, 1723-1733.
- Wolpert, T. J., L. D. Dunkle and L. M. Ciuffetti (2002). *Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name?* Annual Review of Phytopathology, 40, 251-285.

### 2.3 ESTRATEGIA ALTERNA PARA LA PURIFICACIÓN DE FITOTOXINAS HIDROFÍLICAS DE *M. fijiensis*

En la primera parte de este capítulo se reportó el establecimiento de una estrategia reproducible de purificación para el aislamiento de fitotoxinas hidrofílicas (fracciones **G** y **H**) presentes en el filtrado de *M. fijiensis* (Cruz-Cruz *et al.*, 2009). Sin embargo, los bajos rendimientos obtenidos de los metabolitos fitotóxicos como consecuencia del proceso de desalado de las fracciones obtenidas de la correspondiente purificación por HPLC, hizo necesaria la búsqueda de procedimientos alternos para la eliminación de sales y la recuperación de los componentes de interés; de esta manera se evaluó el desalado del liofilizado de las fracciones obtenidas de la purificación por HPLC mediante su extracción con solventes orgánicos (e.g. MeOH absoluto), su purificación por cromatografía en columna de permeación en gel (Sephadex LH-20<sup>®</sup>) y su extracción en fase sólida utilizando diferentes resinas (e.g. Diaion HP-20<sup>®</sup> y Amberlite XAD-2<sup>®</sup>). Los mejores resultados se obtuvieron usando cartuchos “Mass Prep<sup>™</sup> On-Line Desalting Cartridges” y el procedimiento de desalado anteriormente descrito, e.g. cromatografía en columna con gel de sílice de fase normal (Cruz-Cruz *et al.*, 2009). Dado que en ambos casos, independientemente de la cantidad de sales presentes en las fracciones, y de la cantidad de muestra purificada por HPLC semipreparativo (100–500 mg), el rendimiento obtenido de las fracciones fitotóxicas **G** y **H** continuó siendo bajo (Fig. 2.5), se decidió explorar otras estrategias de purificación que permitieran obtener las fitotoxinas de interés, con un mejor rendimiento.



**Figura 2.5.** Rendimiento (en mg) de las fracciones **G** y **H** después del tratamiento de desalado. Independientemente de la cantidad de muestra purificada por HPLC semipreparativo (100–500 mg), el rendimiento obtenido de las fracciones **G** y **H** continuó siendo bajo.



Con base en lo anterior, en esta segunda parte se describen dos estrategias alternas de purificación de los metabolitos fitotóxicos hidrofílicos de *M. fijiensis*; la primera consiste en la utilización de la fracción despigmentada descrita anteriormente como material inicial y la segunda utilizando el extracto MeOH del liofilizado del filtrado crudo de cultivos de *M. fijiensis* como punto de partida.

## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1 Procedimientos generales

Descritos previamente en Cruz-Cruz *et al.*, 2009.

### 2.4.2 Cultivo *in vitro* de banano

El material biológico (cormos y yemas de *Musa acuminata* var. Enano Gigante) fue proporcionado por el MC Alberto Mayo Mosqueda (División de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco). Este material vegetal se utilizó para establecer el cultivo *in vitro* y la generación de plántulas de banano, las cuales fueron aclimatadas en invernadero y utilizadas posteriormente para el bioensayo de gota.

El cultivo *in vitro* de banano se realizó en tres etapas: inducción de yemas, proliferación de yemas y regeneración de plántulas. Para los procedimientos de inducción y proliferación de yemas se utilizó el medio Murashige-Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) (Tabla 2.1), conteniendo 2 mg/L de benzilaminopurina (BAP), con el pH de la solución ajustado a 5.8, y con 0.25% de "gelrite" (Sigma G1910), adicionado antes de esterilizar el medio a 120 °C durante 20 minutos. Se utilizaron frascos Gerber con porciones de 20 mL del medio preparado.

El procedimiento de inducción se realizó con los cormos de banano, incubándolos por tres días en la oscuridad y posteriormente a condiciones de fotoperíodo 8/16 (oscuridad/luz) durante tres semanas a una temperatura de 25 ± 2 °C. Una vez obtenidas las yemas se realizó la proliferación de las mismas, realizando un cambio de medio de cultivo cada dos semanas; lo anterior se llevó a cabo durante un mes.

El procedimiento de regeneración de plántulas se llevó a cabo con las yemas que comenzaban a presentar vestigios de órganos vegetales (tallo y hojas); éstas se transfirieron a frascos Gerber con medio MS sin fitoreguladores y se incubaron por una semana en oscuridad, y durante 30

días en condiciones de fotoperíodo 8/16 (oscuridad/luz), a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Una vez que las plantas generaron raíces y alcanzaron el tamaño y desarrollo suficientes se pasaron a vasos de unicel con suelo estéril y sustrato "peatmoss"; se les cubrió con una bolsa de polietileno con el fin de conservar la humedad y se regaron diariamente por aspersión. Las plántulas se mantuvieron en estas condiciones por 30 días. Posteriormente las plantas se transplantaron en bolsas negras de 5 kg con tierra y "peatmoss" y se les continuó el riego diario.

**Tabla 2.1.** Contenido de nutrientes del medio Murashige-Skoog para la iniciación y mantenimiento del cultivo *in vitro* de banano.

	Componente	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes 1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
Macronutrientes 2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
Macronutrientes 3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400
Solución de Fe	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.2
Micronutrientes	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.18
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9
	KI	0.83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.24
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.024
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
Vitaminas	Glicina	2.0
	Tiamina·HCl	0.1
	Acido Nicotínico	0.5
	Piridoxina·HCl	0.5
	Sacarosa	30000

#### 2.4.3 Purificación del liofilizado D5 por cromatografía en columna con gel de sílice de fase normal

Una porción (200 mg) del liofilizado de la fracción **D5**, obtenida de la purificación por VLC del extracto crudo liofilizado y despigmentado de *M. fijiensis* (Cruz-Cruz *et al.*, 2009), fue resuspendida en una cantidad mínima de H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1), adsorbida en gel de sílice (70-230 mallas), y aplicada a

una columna empacada con gel de sílice (70-230 mallas) de 1 cm de diámetro y 32 cm de altura. La elución se llevó a cabo utilizando una mezcla isocrática de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (14:7:0.5), colectándose 100 fracciones de 2.5 mL. Las fracciones se concentraron y monitorearon por cromatografía en capa delgada (ccd) para combinarlas de acuerdo con su composición. De este tratamiento se colectaron siete fracciones principales I1-I7 con un rendimiento total de recuperación de 87.6%. Las fracciones principales fueron analizadas por HPLC, ubicándose el componente fitotóxico de interés en la fracción I5.

#### **2.4.4. Extracción del filtrado crudo liofilizado (A) con MeOH**

Una porción (14 g) del filtrado crudo liofilizado (A) se resuspendió en 700 mL de metanol; la suspensión se mantuvo con agitación ligera por 4 h a 40 °C. Posteriormente, la suspensión se dejó enfriar y se filtró al vacío. Después de evaporar el disolvente del filtrado, se obtuvieron 7.95 g (56.78%) de extracto metanólico (J1) y 5.56 g (39.71%) de un precipitado insoluble en MeOH (J2), pero soluble en  $\text{H}_2\text{O}$ . El extracto metanólico se resuspendió con 10 mL de agua y se liofilizó.

#### **2.4.5. Purificación del extracto metanólico (J1) por cromatografía líquida al vacío (VLC)**

Una porción del liofilizado J1 (7.0 g) se resuspendió con una mezcla de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  y la suspensión resultante se adsorbió en gel de sílice de 70-230 mallas. La muestra se aplicó a una columna de 6.5 cm de diámetro empacada (5.5 cm de altura) con gel de sílice grado ccd. La elución se llevó a cabo utilizando mezclas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  con gradiente de polaridad ascendente [ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (2:1)/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (14:7:1) hasta MeOH], colectándose fracciones de 250 mL para cada uno de los sistemas de elución empleado. Las fracciones se concentraron y se liofilizaron, obteniéndose 12 fracciones principales (K1-K12) y un rendimiento total de recuperación de 79.73%. Las fracciones principales se analizaron por HPLC, ubicándose el componente fitotóxico de interés en las fracciones K5 y K6.

#### **2.4.6 Purificación de la fracción K5 por cromatografía en columna con gel de sílice de fase normal**

Una porción (200 mg) del liofilizado de K5 fue resuspendida en una cantidad mínima de  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (1:1) y adsorbida en gel de sílice de 70-230 mallas para aplicarse a una columna de 2 cm de diámetro y 32 cm de altura, empacada con gel de sílice de 70-230 mallas. La elución se llevó a cabo utilizando una mezcla isocrática de  $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (6:4:0.25),

colectándose 100 fracciones de 2.5 mL. Las fracciones fueron concentradas y monitoreadas por ccd para combinarlas de acuerdo con su composición. De esta purificación se obtuvieron ocho fracciones principales **L1-L8** y un rendimiento total de recuperación de 84.55%. Las fracciones principales fueron analizadas por HPLC, ubicándose el componente fitotóxico de interés en las fracciones **L2-L7**.

#### **2.4.7 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) de la fracción H**

El análisis por LC-MS se realizó en el Laboratorio de Servicios Metabolómicos del Departamento de Biología Metabólica del "John Innes Centre" (JIC, Norwich, Inglaterra) por el Dr. Lionel Hill. La fracción **H** (1.37 mg) se disolvió en 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y se centrifugó para eliminar impurezas. Una alícuota del sobrenadante (50  $\mu$ L) se analizó por LC-MS usando un sistema de HPLC (Surveyor) acoplado a un espectrómetro de masas (Termo Fisher<sup>®</sup>) con una trampa de iones (DecaXPlus<sup>®</sup>). Se realizaron inyecciones de 2-10  $\mu$ L en una columna C-18 (2) (Luna<sup>®</sup>, 100 x 2mm 3 $\mu$ m) y la separación se llevó a cabo a una temperatura de 30 °C, con un flujo de 260  $\mu$ L/min, utilizando un gradiente de metanol y 0.1% de ácido fórmico en agua (Tabla 2.2) y detectores de UV (190-600 nm) y de electrospray positivo y negativo (polaridades corridas independientemente).

**Tabla 2.2.** Condiciones de elución de la fracción H en LC-MS.

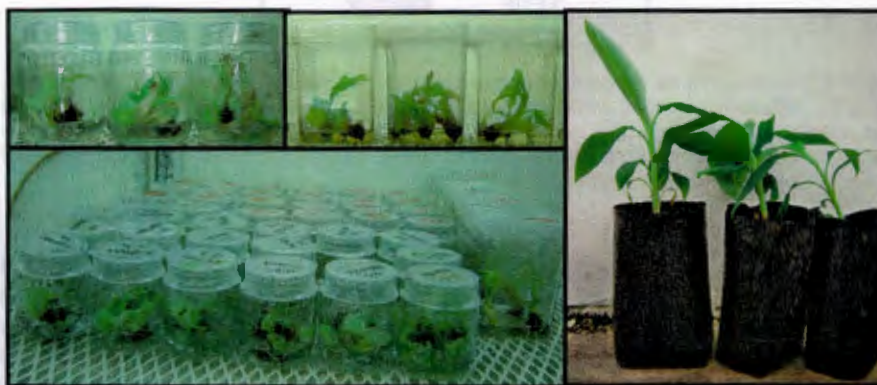
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Metanol (%)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (0.1% Ác. Fórmico)</b>
0	2	98
2	2	98
15	30	70
20	80	20
22	80	20
22.5	2	98
30	2	98

La muestra se analizó utilizando una energía de colisión del 35%, condiciones de 50 unidades de gas en la cámara de spray, 5 unidades de gas auxiliar, una temperatura del capilar de 350 °C, y un voltaje de spray de 5.2 kV. El espectro de masas fue limitado para coleccionar todos los datos espectrales entre 4.0 y 5.0 uma para maximizar los números de iones de

estudio, y se obtuvieron datos espectrales adicionales sometiendo al ion más abundante a nuevas fragmentaciones.

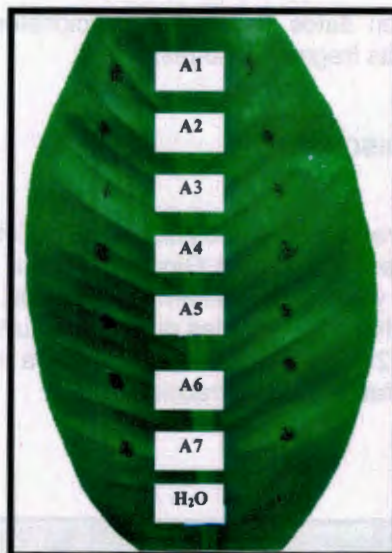
## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante este trabajo se estableció el cultivo *in vitro* de plantas de banano (*Musa acuminata* var. Enano Gigante), con la finalidad de obtener plantas sanas de edad y estado de desarrollo conocido. Se logró contar con plantas de banano de diferentes edades que se mantuvieron en condiciones de invernadero (Fig. 2.6) y fueron utilizadas para evaluar la actividad fitotóxica de los diferentes filtrados y fracciones.



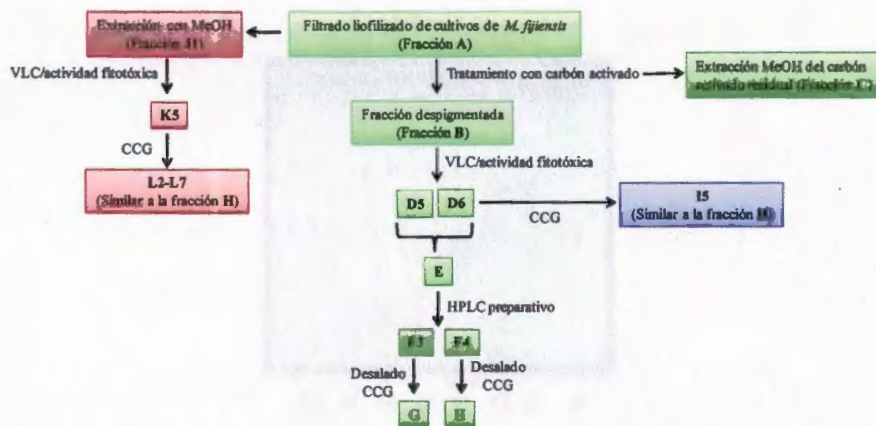
**Figura 2.6.** Cultivo *in vitro* de *Musa acuminata* var. Enano Gigante y plantas de 4 meses de edad establecidas en invernadero.

Como resultado del cultivo masivo de *M. fijiensis* se cosecharon 43.25 L de filtrado crudo, obteniéndose 157.26 g de filtrado de cultivo liofilizado, con un rendimiento promedio de 3.63 g/L. En cada caso, el bioensayo de gota demostró la presencia de actividad fitotóxica, con una área necrótica promedio de 0.36 cm<sup>2</sup> al evaluar los filtrados liofilizados al 3%. Lo anterior confirmó la producción de fitotoxinas de naturaleza hidrofílica por parte del fitopatógeno (Fig. 2.7).



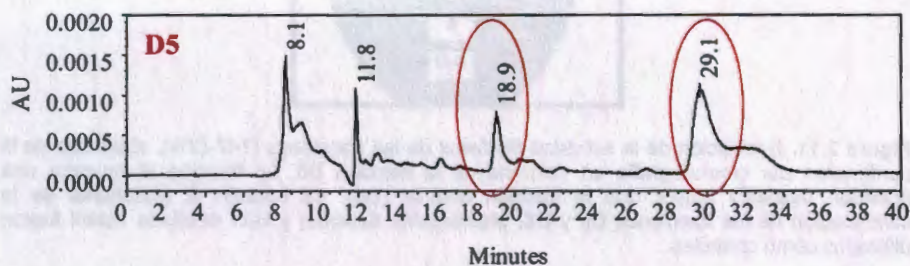
**Figura 2.7.** Evaluación de la actividad fitotóxica de los filtrados liofilizados de *M. fijiensis* (A1-A7) al 3%. Diferentes filtrados crudos obtenidos de cultivos de *M. fijiensis*, inducen un área de daño necrótico promedio de 0.36 cm<sup>2</sup> en la hoja de banana. El daño alrededor de la herida fue cuantificado usando un medidor de área foliar (LI-COR, Lincoln; Nebraska, USA Li-3100). H<sub>2</sub>O destilada estéril fue utilizada como control.

Como una estrategia alterna de purificación de los metabolitos fitotóxicos de *M. fijiensis* se decidió explorar dos alternativas: la purificación sucesiva (VLC y CC) de la fracción despigmentada (B) descrita anteriormente (Cruz-Cruz *et al.*, 2009), y una purificación similar del extracto metanólico del liofilizado del filtrado de cultivos de *M. fijiensis* (J1) (Fig. 2.8).



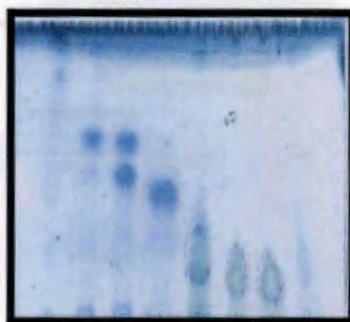
**Figura 2.8.** Diagrama general de purificación del filtrado liofilizado de cultivos de *M. fijiensis* (fracción A).

El perfil por HPLC de la fracción **D5**, obtenida de la purificación por VLC de la fracción despigmentada **B**, mostró la presencia de los componentes principales de las fracciones fitotóxicas **G** y **H** (Fig. 2.9). La purificación de la fracción **D5** por cromatografía en columna de gel de sílice de fase normal resultó en la obtención de siete fracciones principales (**I1-I7**) (Fig. 2.10), una de las cuales (**I5**) mostró una actividad fitotóxica mayor que la fracción **D5** (Fig. 2.11) y la presencia del componente principal de la fracción fitotóxica **H** ( $t_R$  29.1 min) en su perfil cromatográfico por HPLC (Fig. 2.12). En este caso, la fracción fitotóxica **I5** se obtuvo con un rendimiento significativamente mayor (13.71%), al obtenido mediante el tratamiento de desalado (0.6%) para la fracción fitotóxica **H**.



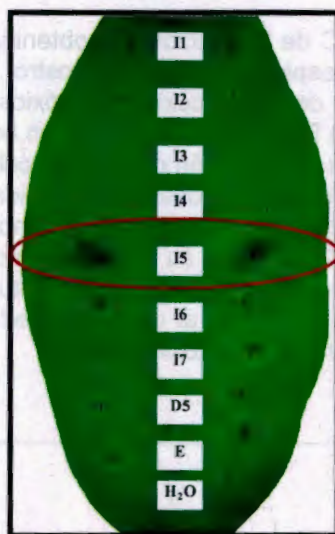
**Figura 2.9.** Perfil cromatográfico por HPLC de la fracción **D5** (obtenida de la purificación por VLC de la fracción despigmentada **B**), incluye los componentes fitotóxicos **G** ( $t_R$  18.8 min) y **H** ( $t_R$  29.1 min).

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8:2)



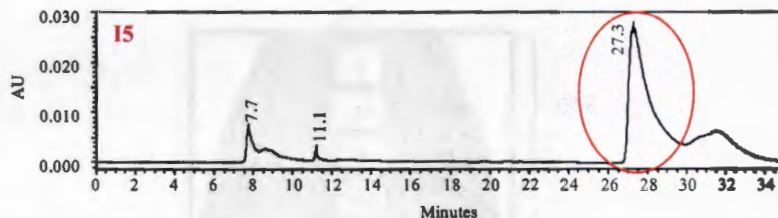
I1 I2 I3 I4 I5 I6 I7 D5

**Figura 2.10.** Perfiles cromatográficos por ccd de las fracciones I1-I7 (obtenidas de la purificación por cromatografía en columna de la fracción D5).



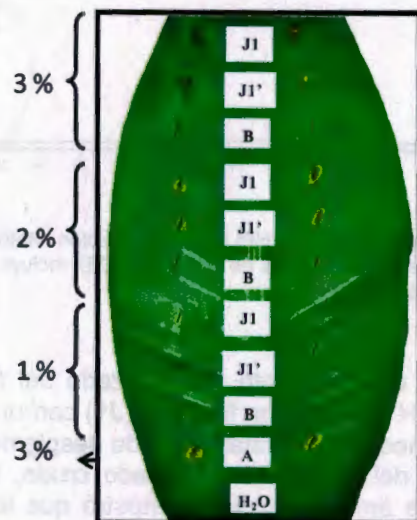
**Figura 2.11.** Evaluación de la actividad fitotóxica de las fracciones I1-I7 (3%), obtenidas de la purificación por cromatografía en columna de la fracción D5. La fracción I5 muestra una actividad fitotóxica mayor que la fracción original (D5). La fracción E (resultante de la combinación de las fracciones D5 y D6, previamente descrita) y H<sub>2</sub>O destilada estéril fueron utilizados como controles.





**Figura 2.12.** Perfil cromatográfico por HPLC de la fracción fitotóxica **15** (obtenida de la purificación por cromatografía en columna de la fracción **D5**), incluye el componente principal de la fracción fitotóxica **H** ( $t_R$  27.3 min).

A pesar que el tratamiento del liofilizado del filtrado crudo de *M. fijiensis* (**A**) con MeOH produjo una fracción (**J1**) con un rendimiento menor (43.4%) al obtenido mediante el tratamiento de despigmentación con carbón activado (**B**, 69.5%) del liofilizado del filtrado crudo, la evaluación de la actividad fitotóxica de ambas fracciones mostró que la fracción **J1** posee una mayor actividad fitotóxica (Fig. 2.13), aun cuando, por ccd, su perfil cromatográfico es muy similar al de la fracción **B** (Fig. 2.14). La purificación sucesiva (VLC y cromatografía en columna) de la fracción **J1** resultó en la obtención, con un alto rendimiento (48.5%), de una fracción fitotóxica (**L2-L7**) que mostró el mismo componente mayoritario por HPLC que la fracción fitotóxica **H**.

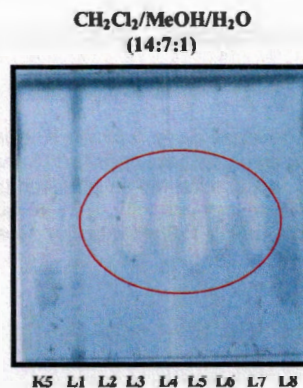


**Figura 2.13.** Evaluación de la actividad fitotóxica de las fracciones **J1** y **B** a diferentes concentraciones. **J1** y **J1'** son extractos metanólicos obtenidos de diferentes filtrados liofilizados de *M. fijiensis* (**A**). **B** fracción libre de pigmentos (previamente descrita) obtenida mediante un tratamiento con carbón activado. Las fracciones **J1** y **J1'** poseen una mayor actividad fitotóxica que la fracción despigmentada (**B**) al 2 y 3%.  $H_2O$  destilada estéril fue utilizada como control.



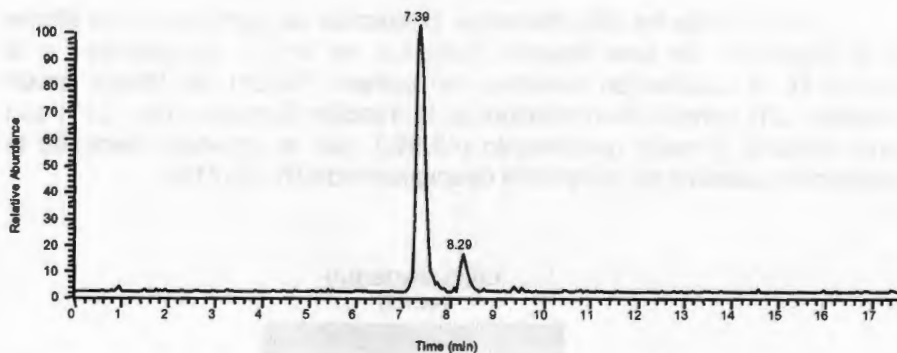
**Figura 2.14.** Comparación de los perfiles cromatográficos por ccd de fracciones despigmentadas (**B** y **B'**) y de extractos MeOH (**J1**, **J1'** y **J1''**) de filtrados liofilizados de *M. fijiensis*. Las diferentes fracciones de **B** y **J** muestran perfiles cromatográficos similares.

Aún cuando los dos diferentes protocolos de purificación resultaron en la obtención de una fracción fitotóxica de similar composición a la fracción H, la purificación sucesiva del extracto MeOH del filtrado crudo liofilizado (J1) permitió la obtención de la fracción fitotóxica (Fig. 2.15) con mayor rapidez y mejor rendimiento (48.5%), que la obtenida mediante la purificación sucesiva de la fracción despigmentada (B, 13.71%).

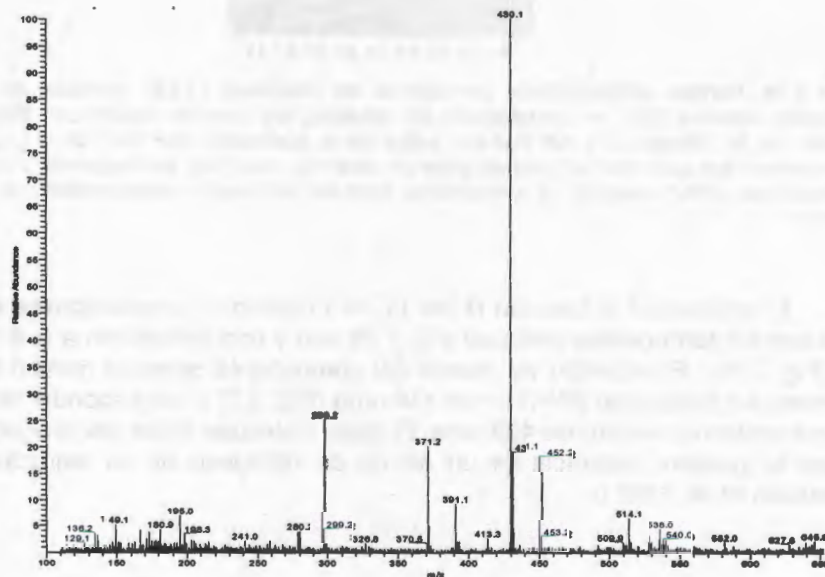


**Figura 2.15.** Perfiles cromatográficos por ccd de las fracciones L1-L8, obtenidas de la purificación sucesiva (VLC y cromatografía en columna) del extracto MeOH del filtrado liofilizado de *M. fijensis* (J1). K5 fracción activa de la purificación por VLC de J1, que posteriormente fue purificada por cromatografía en columna, resultando las fracciones L1-L8. Las fracciones L2-L7 muestran el componente fitotóxico de interés correspondiente a la fracción H.

El análisis de la fracción H por LC-MS mostró un cromatograma de iones con un componente principal a  $t_R$  7.39 min y uno minoritario a  $t_R$  8.29 min (Fig. 2.16). El espectro de masas del componente principal mostró un ion molecular protonado  $[M+1]$  a  $m/z$  430 uma (Fig. 2.17), correspondiente a un peso molecular neutro de 429 uma. El peso molecular impar del producto sugiere la posible presencia de un átomo de nitrógeno en su estructura (Silverstein *et al.*, 1981).



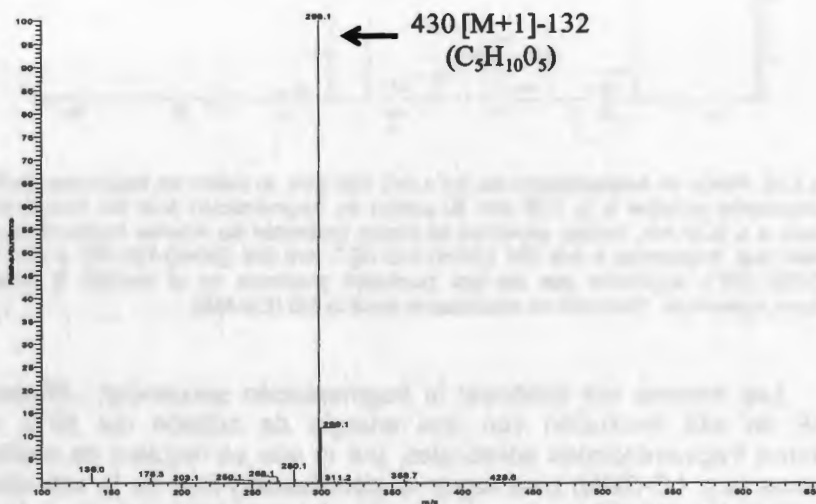
**Figura 2.16.** Cromatograma de iones de la fracción H muestra un componente principal a  $t_R$  7.39 min. El análisis se realizó en un sistema de HPLC (Surveyor) acoplado a un espectrómetro de masas (Thermo Fisher®). La separación fue asistida con una columna C-18 (2) (Luna®, 100 x 2mm 3 $\mu$ m) utilizando un gradiente de metanol y 0.1% de ácido fórmico en agua 30 °C, con un flujo de 260  $\mu$ L/min, detectores de UV (190-600 nm) y de electro spray positivo y negativo MS (ESI-MS).



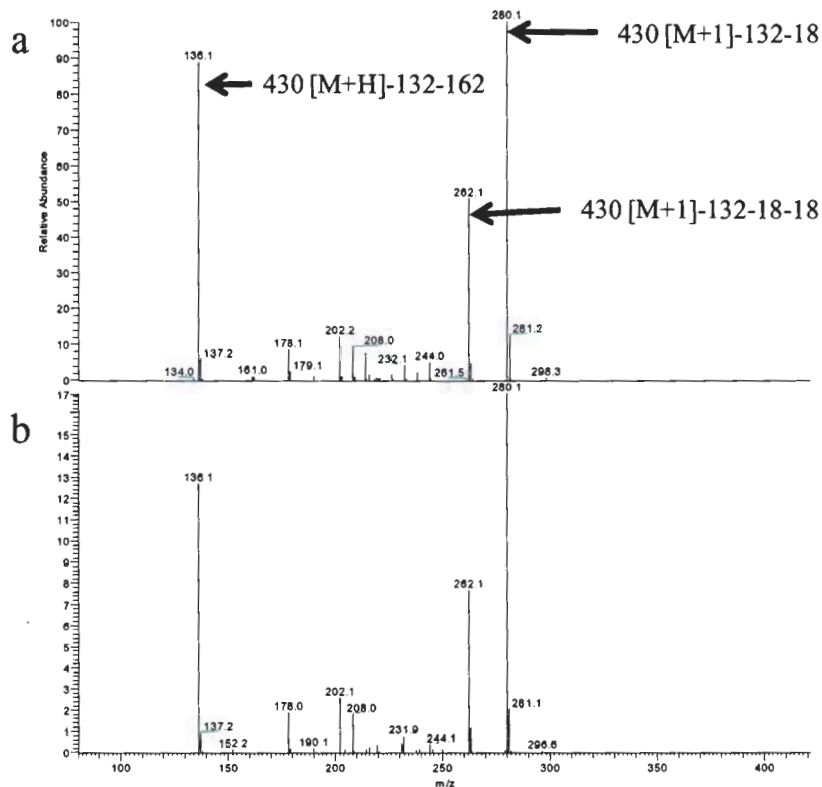
**Figura 2.17.** El espectro de masas del componente principal a  $t_R$  7.39 min de la fracción H muestra un ion molecular protonado  $[M+1]$  a  $m/z$  430 uma, correspondiente a un peso molecular neutro de 429 uma. Detección de electro spray positivo MS (ESI-MS).

El análisis de fragmentación sucesiva del ion molecular protonado  $[M+1]$  a  $m/z$  430 una mostró un fragmento a  $m/z$  298  $[(M+H)-132]^+$  (Fig. 2.18), en tanto que el patrón de fragmentación del ion a  $m/z$  298 una mostró a su vez, un fragmento a  $m/z$  136  $[(M+H)-132-162]^+$  (Fig. 2.19a). En un contexto biológico, y siendo el componente mayoritario de la fracción H una molécula hidrofílica, los fragmentos de 132 y 162 podrían explicarse mediante la pérdida secuencial de los residuos de una pentosa ( $C_5H_8O_4$ ) y una hexosa ( $C_6H_{10}O_5$ ), respectivamente. Lo anterior se apoya con la presencia de fragmentos a  $m/z$  280  $[(M+H)-132-18]^+$  y  $m/z$  262  $[(M+H)-132-36]^+$  (Fig. 2.19a), característicos de la pérdida de grupos oxhidrilos en moléculas que contienen azúcares (Silverstein *et al.*, 1981).

El patrón de fragmentación del componente minoritario (8.29 min) de la fracción H mostró un ion molecular protonado  $[M+1]$  a  $m/z$  430 una, que mostró las mismas fragmentaciones secuenciales a las observadas para el ion molecular protonado del componente principal (Fig. 2.19b). Lo anterior sugiere que los dos productos presentes en la fracción H poseen estructuras isoméricas.



**Figura 2.18.** Patrón de fragmentación del ion protonado  $[M+1]$  a  $m/z$  430 una. La fragmentación del ion molecular a  $m/z$  430 una mostró un fragmento a  $m/z$  298  $[(M+H)-132]^+$ . Indicando la fragmentación de un residuo de pentosa ( $C_5H_8O_4$ ). Detección de electrospray positivo MS (ESI-MS).



**Figura 2.19.** Patrón de fragmentación del ion a  $m/z$  298 uma. a) patrón de fragmentación final del componente principal a  $t_R$  7.39 min b) patrón de fragmentación final del componente minoritario a  $t_R$  8.29 min. Ambos espectros de masas presentan las mismas fragmentaciones sucesivas (e.g. fragmentos a  $m/z$  280 [(M+H)-132-18]<sup>+</sup>,  $m/z$  262 [(M+H)-132-36]<sup>+</sup> y  $m/z$  136 [(M+H)-132-162]<sup>+</sup>), sugiriendo que los dos productos presentes en la fracción H poseen estructuras isoméricas. Detección de electrospray positivo MS (ESI-MS).

Los intentos por continuar la fragmentación secuencial, utilizando LC-MS de alta resolución con una energía de colisión del 50%, no mostraron fragmentaciones adicionales, por lo que se requiere de análisis diferentes (e.g. LC-RMN) para lograr la identificación final de la estructura de la fitotoxina hidrofílica correspondiente al componente principal de la fracción H.

## 2.6 CONCLUSIONES

Se estableció una estrategia alterna de purificación de la fracción fitotóxica **H** por cromatografía en columna de gel de sílice de fase normal, a partir de purificaciones sucesivas de la fracción despigmentada (**B**) ó del extracto MeOH del filtrado crudo liofilizado, con mayor rapidez y mayores rendimientos (13.71% y 48.5% respectivamente) en comparación al obtenido con el tratamiento de desalado (0.6%).

El análisis de la fracción **H** por LC-MS mostró la presencia de un componente principal a  $t_R$  7.39 min y uno minoritario a  $t_R$  8.29 min, con estructuras isoméricas.

El espectro de masas del componente principal de la fracción **H** mostró un ion molecular protonado  $[M+1]$  a  $m/z$  430 uma, correspondiente a un peso molecular neutro de 429 umas, sugiriendo la presencia de nitrógeno en la estructura.

Las fragmentaciones secuenciales del ion molecular  $[M+1]$  a  $m/z$  430 uma mostró fragmentos de  $m/z$  298  $[(M+H)-132]^+$  y  $m/z$  136  $[(M+H)-132-162]^+$  que podrían corresponder a la pérdida secuencial de residuos de una pentosa ( $C_5H_8O_4$ ) y una hexosa ( $C_6H_{10}O_5$ ), respectivamente.

## 2.7 BIBLIOGRAFÍA

- Aquino, R., C. Conti., F. DeSimone., N. Orsi., C. Pizza and M. L. Stein (1991). *Antiviral of constituents of Tamus communis*. Journal of Chemotherapy, 3, 305-309.
- Cioffi, G., F. Dal Piaz., P. De Caprariis., R. Sanogo., S. Marzocco., G. Autore and N. De Tommasi (2006). *Antiproliferative Triterpene Saponins from Entada africana*. Journal of Natural Products, 69, 1323-1329.
- Cruz-Cruz, C. A., K. García-Sosa., F. Escalante-Erosa and L. M. Peña-Rodríguez (2009). *Production of hydrophilic phytotoxins by Mycosphaerella fijiensis*. Journal of General Plant Pathology, 75(3), 191-195.
- Hostettmann, K., M. Hostettmann and A. Marston (1985). "Combination of Methods", in *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product isolation*. Springer-Verlag, pp. 127-135.
- Kato, A., T. Miura and T. Fukunaga (1995). *Effects of steroidal glycosides on blood glucose in normal and diabetic mice*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 18, 167-168.
- Matsushita, A., T. Miyase., H. Noguchi and D. V. Velde (2004a). *Oleanane Saponins from Sanicula elata var. chinensis*. Journal of Natural Products, 67, 377-383.
- Matsushita, A., Y. Sasaki., T. Warashina., T. Miyase., H. Noguchi and D. V. Velde (2004b). *Hydrocotylosides I-VII, New Oleanane Saponins from Hydrocotyle sibthorpioides*. Journal Natural Products, 67, 384-388.
- Meyer, V. R. (1994). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons. pp. 1-16.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.



- Ohra, J., K. Morita., T. Tsujino., T. Fujimori., M. Goering., S. Evans and P. Zorner (1995). *Production of two phytotoxic metabolites by the fungus Alternaria cassiae*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 59: 1782-1783.
- Osbourn, A. E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, 8, 1821-1831.
- Salituro, G. M. and C. Dufresne (1998). "Isolation by Low-Pressure Column Chromatography", in *Methods in Biotechnology: Natural products Isolation*. Cannell, R. J. P. (ed). Human Press Inc., Totowa, New Jersey. pp. 111-164.
- Sánchez-Medina, A., P. C. Stevenson., S. Habtemariam., L. M. Peña-Rodríguez., O. Corcoran., A. I. Mallet and N. C. Veitch (2009). *Triterpenoid saponins from a cytotoxic root extract of Sideroxylon foetidissimum subsp. gaumeri*. *Phytochemistry*, 70, 765-772.
- Seo, Y., J. M. Berger., J. Hoch., K. M. Neddermann and I. Bursuker (2002). *A new Triterpene Saponin from Pittosporum viridiflorum from the Madagascar Rainforest*. *Journal of Natural Products*, 65, 65-68.
- Silverstein, B. and Morrill. (1981). *Spectrometric identification of organic compounds*. Fourth Edition, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. pp. 3-43.
- Shaw, P. (1981). "Production and Isolation", in *Toxins in plant disease*, Durbin R. D. (ed). Academic Press, Inc, pp 21-33.
- Shimizu, Y. (1998). "Purification of water-soluble natural products", in *Methods in Biotechnology: Natural products Isolation*, Cannell, R. J. P. (ed). Human Press Inc., Totowa, New Jersey. pp. 329-341.
- Strange, R. (2007). *Phytotoxins produced by microbial plant pathogens*. *Natural Product Reports*, 24,127-144.
- Sung, M. K., C. W. C. Kendall and A. V. Rao (1995). *Effect of saponins and Gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture*. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 357-366.
- Yang, D. J., T. J. Lu and L. S. Hwang (2003). *Isolation and identification of Saponins in Taiwanese Yam Cultivar (Dioscorea pseudojaponica Yamamoto)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6438-6444.

Zhang, J., Z. Meng., M. Zhang., D. Ma., S. Xu and H. Kodama (1999). *Effect of six steroidal saponins isolated from Anemarrhenae rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood*. Clinica Chimica Acta, 289, 79-88.

## CAPÍTULO 3

### Evaluación de la selectividad, sitio y mecanismo de acción de las fitotoxinas hidrofílicas de *M. fijiensis*

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

La determinación del papel que juegan los metabolitos fitotóxicos en la patogénesis o en la virulencia es crítica para la contribución al conocimiento en la interacción de cualquier patosistema (Strange, 2007). Un aspecto importante en el estudio de las fitotoxinas es conocer su mecanismo y su sitio de acción. Las fitotoxinas pueden ejercer sus efectos sobre la estructura y función de la membrana plasmática y de los organelos subcelulares, inhibiendo enzimas específicas o interfiriendo con los mecanismos de defensa (Prell & Day, 2000; Jeng-Sheng, 2001; Markham, 2001; Strange, 2007).

El número de estudios sobre la selectividad y el mecanismo de acción de las diferentes fitotoxinas lipofílicas producidas por *M. fijiensis* es limitado; aunque se ha reportado que la fijiensina posee actividad fitotóxica hacia diferentes cultivares de banano, pero no hacia plantas no hospederas (e.g. arroz, sorgo, algodón, maíz y cebada) (Upadhyay *et al.*, 1991), actualmente esta fitotoxina es considerada una no-HST al no reproducir los patrones de resistencia y susceptibilidad en plantas de plátano y banano (Stierle *et al.*, 1991). Hasta ahora, la única fitotoxina producida por *M. fijiensis* considerada como HST es la 2,4,8-trihidroxitetralona, dado que ésta reproduce los patrones de virulencia del patógeno (Stierle *et al.*, 1991; Hoss *et al.*, 2000); el resto de las fitotoxinas lipofílicas producidas por *M. fijiensis* son consideradas no-HST's, dado que su actividad fitotóxica no muestra una correlación directa con el grado de resistencia o susceptibilidad de las plantas a la enfermedad (Stierle *et al.*, 1991; Hoss *et al.*, 2000),

Con respecto al estudio de los sitios y mecanismos de acción de las fitotoxinas lipofílicas de *M. fijiensis*, se ha reportado que su actividad es dependiente de la luz, sugiriendo al aparato fotosintético como sitio de acción (Busogoro *et al.*, 2004a,b; Balint-Kurti & Churchill, 2004; Carlier *et al.*, 2000). Asimismo, se ha reportado que la juglona actúa a nivel de cloroplasto, interfiriendo con el gradiente electroquímico de protones que cruza la membrana plasmática e incrementando la pérdida de electrolitos

(Lepoivre *et al.*, 2002). Por otra parte, recientemente se demostró que en variedades de banano parcialmente resistentes a la Sigatoka negra (e.g. Fougamou), la juglona provoca una producción temprana de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una rápida estimulación de un sistema antioxidante que disminuye los daños al tejido vegetal, en tanto que en variedades altamente susceptibles (e.g. Enano Gigante), la inducción de ROS por parte de la juglona es tardía, ocasionando una lenta estimulación del sistema antioxidante y un desbalance entre la generación de ROS y su eliminación por los sistemas antioxidantes de la planta (El Hadrami *et al.*, 2005).

Con base a lo anterior, y dado que hasta ahora no existen estudios sobre la selectividad, sitio y mecanismo de acción de las fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis*, y que el papel que estos metabolitos fitotóxicos juegan en el proceso de infección se desconoce, en este capítulo se incluye una copia de un manuscrito sometido para publicación que describe la evaluación de la selectividad de las fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis*, además de su efecto sobre la permeabilidad de la membrana plasmática en diferentes hospederos y su inducción de la producción de ROS como posible mecanismo de acción.

### 3.2 BIBLIOGRAFÍA

- Balint-Kurti, P. and A. C. L. Churchill (2004). "Towards a molecular understanding of *Mycosphaerella*/banana interactions", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, USA. pp. 147-159.
- Busogoro, J. P., J. J. Etamé., G. Harelimana., G. Lognay., J. Messiaen., P. Lepoire and P. van Cutsem (2004a). "Experimental evidence for the action of *M. fijiensis* toxins on banana photosynthetic apparatus", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, USA. pp. 161-170.
- Busogoro, J. P., J. J. Etamé., G. Lognay., J. Messiaen., P. van Cutsem and P. Lepoire (2004b). "Analysis of the mechanisms of action *Mycosphaerella fijiensis* toxins during the development of black leaf streak disease", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, USA. pp. 171-181.
- Carlier, J., E. Fouré., F. Gauhl., D. R. Jones., P. Lepoivre., X. Mourichon., C. Pasberg-Gauhl and R. A. Romero (2000). "Fungal Diseases of the Foliage", in *Diseases of banana, abacá and ensent*, Jones, D. R. (ed). CABI Publishing, New York, USA. pp. 1-4, 37, 72-75.
- El Hadrami, A. E., D. Kone and P. Lepoivre (2005). *Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to black leaf streak disease*. European Journal of Plant Pathology, 113, 241-254.
- Hoss, R., J. Helbig and H. Bochow (2000). *Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (Musa spp.-Mycosphaerella fijiensis)*. Journal of Phytopathology, 148, 387-394.
- Jeng-Sheng, H. (2001). *Plant Pathogenesis and resistance: Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. pp. 292-383.

- Lepoivre, P., J. P. Busogoro., A. El Hadrami., J. Carlier., G. Harelimana., X. Mourichon., B. Panis., A. Stella-Riveros., N. Roux., G. Sallé., H. Strosse and R. Swennen (2002). "Banana-*Mycosphaerella fijiensis* (black leaf streak disease) interactions" in *Proceeding of the Second International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas*, INIBAP San José, Costa Rica. pp. 20-23.
- Markham, J. E. and J. Hille (2001). *Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions*. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 229-239.
- Prell, H. H. and P. R. Day (2000). *Plant-Fungal Pathogen Interaction: A Classical and Molecular View*. Springer, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapore, Tokio. pp. 57-64.
- Stierle, A. A., R. Upadhyay., J. Hershenhorn., G. A. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains*. *Experientia*, 47, 853-858.
- Strange R. (2007). *Phytotoxins produced by microbial plant pathogens*. *Natural Product Reports*, 24,127–144.
- Upadhyay, R. K., G. A. Strobel., S. J. Coval and J. Clardy (1990). *Fijiensin, the first phytotoxin from M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease*. *Experientia*, 47, 982-984.

### 3.3 ON THE SELECTIVITY, MECHANISM, AND SITES OF ACTION OF THE HYDROPHILIC PHYTOTOXINS PRODUCED BY *Mycosphaerella fijiensis*, THE CAUSAL AGENT OF BLACK SIGATOKA IN BANANA PLANTS<sup>§</sup>

C. A. Cruz-Cruz, K. García-Sosa, F. Escalante-Erosa and L. M. Peña-Rodríguez

#### 3.3.1 Abstract

Phytotoxins have been classified, taking into account their role in infectious process, as host selective (HSTs) and non-host selective phytotoxins (non-HSTs). Although a number of lipophilic HSTs and non-HSTs are known to be produced by *Mycosphaerella fijiensis*, it is only recently that production of hydrophilic phytotoxins by this phytopathogen was reported. Similarly, although previous studies have proposed that the lipophilic phytotoxins of *M. fijiensis* exert their effect at the chloroplast level and might be involved in oxidative damage, to date the mechanism of action and the role of the hydrophilic phytotoxins in the infectious process is unknown. In this investigation we show that the hydrophilic phytotoxins are non-HSTs and that their phytotoxic effect is not light dependant. Additionally, our results indicate that the site of action of these metabolites is the plasma membrane and that their induction of ROS production might be part of their mechanism of action during the infectious process.

**Key words:** phytotoxins, *Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* spp., black Sigatoka, electrolyte leakage assay, reactive oxygen species.

<sup>§</sup>Este capítulo ha sido sometido para su publicación en *Physiological and Molecular Plant Pathology*

---

\* corresponding author; Tel.: +52-999-9428330 ext. 159; Fax: +52-999-9813900; e-mail: [lmanuel@cicy.mx](mailto:lmanuel@cicy.mx)

### 3.3.2 Introduction

Phytotoxins are secondary metabolites produced by phytopathogens that may cause adverse effects on plant metabolism (Knoche & Duvick, 1987; Prell & Day, 2000; Jeng-Sheng, 2001); these metabolites have been classified, taking into account their role in the infectious process, as host selective (HSTs) and non-host selective phytotoxins (non-HSTs) (Strange, 2003). While HSTs are required for the pathogen to colonize the plant, and are toxic only to hosts of the pathogen that produces them (Scheffer & Livingston, 1984; Walton, 1996; Markham & Hille, 2001; Wolpert *et al.*, 2002), non-HSTs are not essential for the infectious process, but they contribute to the virulence of the pathogen (Mitchell, 1984; Ballio, 1991).

The hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* Morelet is recognized as the causal agent of black Sigatoka, the most destructive and devastating disease of bananas and plantains in almost all producing regions of the world (Carlier *et al.*, 2000). The symptoms of the disease include elongated necrotic lesions, surrounded by chlorotic zones, which suggest the involvement of phytotoxins (Upadhyay *et al.*, 1990). *M. fijiensis* is known to produce lipophilic phytotoxins (Upadhyay *et al.*, 1990; Stierle *et al.*, 1991; Hoss *et al.*, 2000), with 2,4,8-trihydroxytetralone being the most abundant and phytotoxic, having a host-selectivity similar to that of the pathogen (Stierle *et al.*, 1991). The number of studies about the mechanism of action of the different lipophilic phytotoxins produced by *M. fijiensis* is limited; however it has been reported that their activity is light-dependant and that they affect the plant at the chloroplast level, disturb the proton electrochemical gradient across the plasmalemma membrane, increase electrolyte leakage, and induce an oxidative burst during the phytotoxin-*Musa* spp. interaction (Harelimana *et al.*, 1997; Lepoivre *et al.*, 2002; Busogoro *et al.*, 2004a,b; El Hadrami *et al.*, 2005). Recently, the production of hydrophilic phytotoxins by *M. fijiensis* was reported (Cruz-Cruz *et al.*, 2009); considering that there are no studies on the site or mechanism of action of these metabolites, and that their role in the infectious process is unknown, we describe here the evaluation of the selectivity of the hydrophilic phytotoxins produced by *M. fijiensis* and their light dependency, together with their effect on the permeability of the plasma membrane and their ability to induce the production of reactive oxygen species (ROS) in susceptible banana plants.



### 3.3.3 Materials and methods

#### 3.3.3.1 General experimental procedures

Technical-grade solvents, distilled in the laboratory, together with analytical (J.T. Baker) and high performance liquid chromatography (HPLC) grade (J.T. Baker) solvents, were used in the various extraction and purification procedures. Solvents were evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator (Büchi, model 111) equipped with a water bath (Büchi, model 461) which was kept at 40 °C. The lyophilization of aqueous fractions was carried out using a LABCONCO freeze dryer model 7753020. The purifications by vacuum liquid chromatography (VLC) and column chromatography were carried out using TLC-grade E. M. Merck silica gel 60GF and Merck silica gel (70-230 mesh), respectively. Analytical TLC was carried out using aluminum-backed silica gel (60F<sub>254</sub>) plates (E.M. Merck, 0.2 mm thickness). The various components in the chromatograms were visualized by dipping the plates in a solution of phosphomolibdic acid (20 g) and ceric sulfate (2.5 g) in 500 mL of sulfuric acid (5%), followed by drying and gentle heating. The different fractions were monitored by analytical HPLC using a Waters 600 series system equipped with a Waters 2487 UV/Vis detector and a Waters 600E controller loaded with the program Millennium. Separations were carried out using a Waters C18 Spherisorb analytical column (5 µm ODS2; 4.6 mm id, 250 mm long,) and a 10:90 mixture of CH<sub>3</sub>CN:buffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM, pH 2.5 adjusted with perchloric acid) as the mobile phase; with a flow rate of 0.3 mL/min and the detector set at both 240 and 260 nm.

#### 3.3.3.2 Biological material

The strain of *M. fijiensis* (C-1233) was kindly donated by Dr. Jean Carlier (CIRAD, France). The banana plant material (corms and buds of *Musa acuminata* cv. Grande Naine) used for establishing the *in vitro* cultures was provided by Alberto Mayo (UJAT, Villermosa, Tabasco, México). Different varieties of bananas plants were obtained from collections growing in an experimental field (INIFAP-UXMAL, Uxmal Km 72 Carretera Mérida-Uxmal) and the greenhouses at CICY. The plant material was provided by Dr. James Andrew Kay and Dr. Rosa Maria Escobedo (CICY, Mérida, Yucatán, México).

#### 3.3.3.3 Culturing conditions of *M. fijiensis*

*M. fijiensis* strain C-1233 was cultured, maintained and processed to yield the crude filtrate F1 following a procedure described previously (Cruz-Cruz *et al.*, 2009).

#### **3.3.3.4 Methanol extraction of F1**

The lyophilized crude filtrate (**F1**, 14 g) was suspended in 700 mL of methanol; the suspension was maintained with stirred slowly for 4 hours at 40 °C. The suspension was allowed to cool and then filtered; evaporation of the solvent yielded 7.95 g of methanolic extract (**F2**) and 5.56 g of a residue (**F3**) which proved to be insoluble in MeOH, but soluble in H<sub>2</sub>O. Both the filtrate and the residue were resuspended with 10 mL of water and lyophilized.

#### **3.3.3.5 Vacuum liquid chromatography purification of F2**

A portion of the methanol extract (**F2**, 7 g) was purified by VLC using a stepwise gradient elution with dichloromethane/methanol (2:1) to dichloromethane/methanol/water (14:7:1) mixtures, followed by a wash with MeOH, to produce twelve main fractions (**F4a** to **F4l**). Leaf-spot assay evaluation of all fractions (3%) indicated that the phytotoxic activity was located in fraction **F4e** (736.8 mg).

#### **3.3.3.6 Column chromatography purification of F4e**

A portion of the fraction **F4e** (200 mg) was purified by column chromatography using an isocratic elution with ethylacetate/methanol/water (6:4:0.25), to produce four main fractions (**F5a** to **F5d**). Leaf-spot assay evaluation of all fractions (3%) indicated that the phytotoxic activity was located in fraction **F5b** (142.4 mg).

#### **3.3.3.7 Leaf-spot assay**

The phytotoxic activity of the filtrate and the different purified fractions was evaluated using a leaf-spot assay on healthy leaves of different genotypes of banana plants (*Musa* spp.) as described (Cruz-Cruz *et al.*, 2009).

#### **3.3.3.8 Electrolyte leakage assay**

Twenty discs (6 mm in diameter; ca. 100 mg fw), collected from the first or second youngest leaf of a four-month-old banana plant (*M. acuminata* cv. Grande naine, Tuu Gia and Fougamou) growing in pots under greenhouse conditions, were placed in vials containing 1 mL of a 2% deionized water-solution of the different fractions to evaluate. The discs were vacuum-infiltrated during 30 minutes and the vials were kept at room temperature, under natural light conditions, for 24 hours. After the incubation

period, the discs were rinsed five times with 1 mL of deionized water and placed in Falcon tubes containing 15 mL of deionized water. Conductivity measurements were determined every two hours (up to 24 h), using a conductivity meter (Hi8733, HANNA instruments). The maximum leakage ( $L_{max}$ ) was established by sterilizing twenty discs in 15 mL of deionized water and measuring the conductivity of the supernatant.

#### 3.3.3.9 NBT staining

Histochemical staining for  $O_2^{\cdot-}$  production in banana (*Musa acuminata* cv. Grande naine) leaf discs was based on the ability of cells to reduce nitroblue tetrazolium (NBT) as described by Arreola-Cortés *et al.*, 2007. Segments of leaves after different times of treatment (0, 15', 30', 1, 1.5, 2, 4 and 6 h) with the hydrophilic phytotoxin **F5b** using the leaf-spot assay, were vacuum-infiltrated during 30 min with 0.05M sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.05% NBT (Sigma Chemical Co., > 99%). After 12 h of staining at room temperature, under natural light, the NBT treated tissues were placed in 96% (v/v) ethanol, boiled during 15 min (2x) to stop the reaction, and soaked several times (a minimum of 3x) to remove chlorophyll and preserve tissue integrity.

#### 3.3.3.10 DAB staining

Histochemical staining for  $H_2O_2$  production in banana (*Musa acuminata* cv. Grande naine) leaf discs was visualized by observing the visible brown stain resulting from the local polymerization of 3-3'-diaminobenzidine (DAB) in the presence of  $H_2O_2$  and peroxidase, where the intensity of the stain corresponds to the amount of  $H_2O_2$  (Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Yakimova *et al.*, 2009). Segments of leaves after different times of treatment (0, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h) with the hydrophilic phytotoxin **F5b** using the leaf-spot assay, were vacuum-infiltrated during 30 minutes with  $1\text{mg mL}^{-1}$  of DAB (Sigma Chemical Co., > 99%) (pH 3.8 with HCl). After 12 h of staining at room temperature under natural light, the DAB treated tissues were placed in 96% (v/v) ethanol, boiled during 15 min (2x) to stop the reaction, and soaked several times (a minimum of 3x) to remove chlorophyll, and preserve tissue integrity.

#### 3.3.3.11 Statistical analysis

The phytotoxic damage caused by the semi-purified fractions of *M. fijiensis* and the hydrophilic phytotoxic metabolite **F5b** on banana leaves of plants with different levels of resistance to black Sigatoka, was analyzed using SPSS® software (version 11.5) and the results are presented as means ( $\pm$  DS). To determine the significant differences between varieties,

results were analyzed using a one-way ANOVA test and *P*-values of < 0.05 were considered significant. Each experiment was run with three replicates per treatment and repeated at least twice.

### 3.3.4 Results and discussion

The bioassay-guided purification of the methanolic extract of the crude filtrate of *M. fijiensis*, using a combination of VLC and column chromatography, resulted in the isolation of a pure phytotoxic metabolite (**F5b**), which proved to be identical by HPLC to one previously reported as present in a hydrophilic phytotoxic fraction from *M. fijiensis* (Cruz-Cruz *et al.*, 2009).

Testing the phytotoxic activity of the hydrophilic phytotoxic metabolite **F5b**, on the leaves of four-month-old banana (*Musa* spp.) plants having different levels of resistance and susceptibility to black Sigatoka (Table 3.3.1), showed that there is no correlation between the phytotoxic activity detected in the leaves and the corresponding level of resistance and susceptibility of the plants to the disease; namely, and even though a high phytotoxic activity was detected on the leaves of two susceptible varieties to black Sigatoka (Grande naine and Macho Chifle) and no activity was observed in the leaves of the resistant variety Datil P. liliin, the moderate activity detected in the leaves of the highly-resistant varieties (Tuu Gia, Malaccensis CICY and Malaccensis Selangor), was similar to that observed in two of the susceptible varieties (Dominico Hartón and Manzano) (Fig. 3.3.1a).

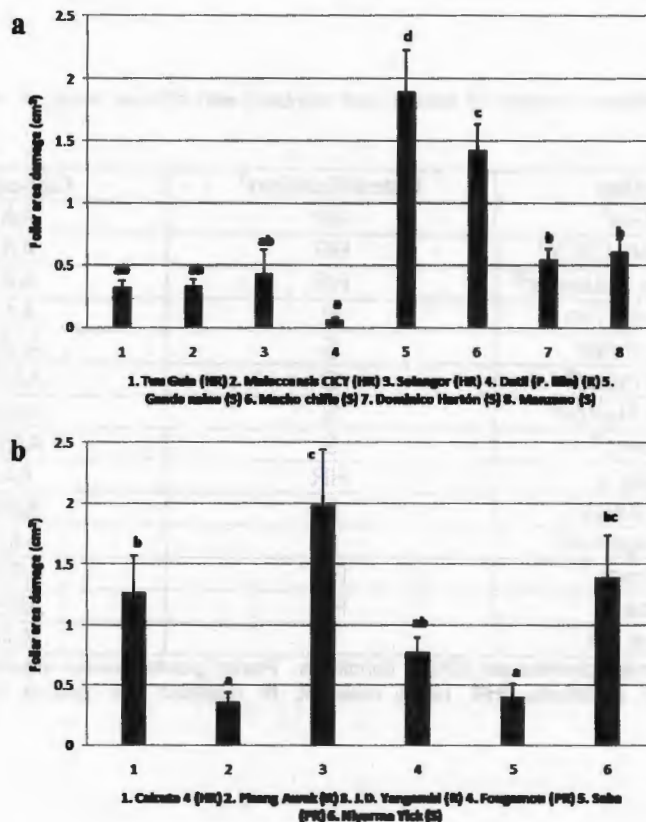
Similar testing of the hydrophilic phytotoxic metabolite **F5b** on the leaves of banana plants growing in an experimental field, confirmed the results described above, i.e. while the testing of the phytotoxic metabolite on the leaves from resistant (Pisang Awak) and partially resistant varieties (Fougamou and Saba) showed moderate phytotoxic activity, testing on the leaves of highly resistant (Calcuta 4), resistant (J.D. Yangambi), and susceptible varieties (Niyarma Yik) showed a similar, high phytotoxic activity, for the three varieties (Fig. 3.3.1b). Even though the lack of selectivity was most evident when testing the phytotoxic metabolite on the leaves of plants from the experimental field than from those grown in the greenhouse, the lack of information about the age and developmental stage of the former group limits the interpretation of the results and its possible conclusions. Still, taking into account the low correlation observed between the activity of the hydrophilic phytotoxic metabolite of *M. fijiensis* and the different levels of resistance and susceptibility of the different genotypes of banana plants to black Sigatoka, and following the criteria generally accepted for the

classification of phytotoxins, it can be concluded that the hydrophilic phytotoxins produced by *M. fijiensis* are non-HSTs.

**Table 3.3.1.** Different varieties of banana and plantains with different levels of resistance to black Sigatoka.

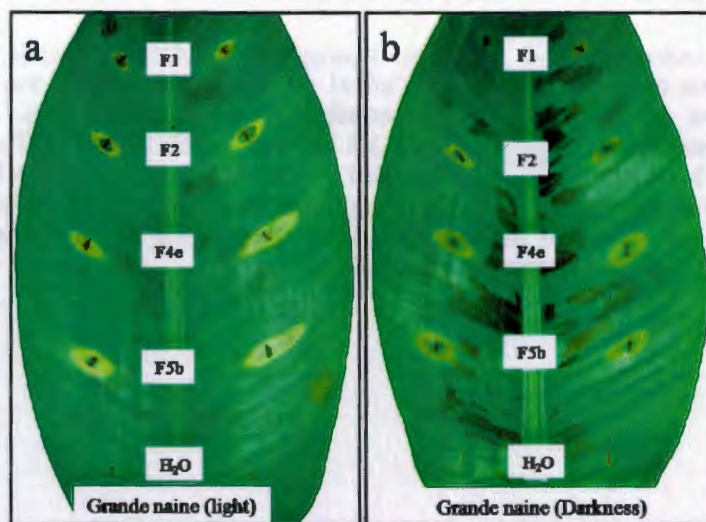
Varieties	Classification <sup>5</sup>	Genome
Tuu Gia <sup>9</sup>	HR	AA
Malaccensis CICY <sup>9</sup>	HR	AA
Malaccensis Selangor <sup>9</sup>	HR	AA
Datil (Pisang lilin) <sup>9</sup>	R	AA
Macho chifle <sup>9</sup>	S	AAB
Grande naine <sup>9</sup>	S	AAA
Dominico Hartón <sup>9</sup>	S	AAB
Manzano <sup>9</sup>	S	AAB
Calcuta 4 <sup>1</sup>	HR	AA
Pisang Awak <sup>1</sup>	R	ABB
J.D. Yangambi <sup>1</sup>	R	AAA
Fougamou <sup>1</sup>	PR	ABB
Saba <sup>1</sup>	PR	ABB
Niyarma Yik <sup>1</sup>	S	AA

<sup>9</sup>Plants kept under greenhouse (CICY) conditions. <sup>1</sup>Plants growing under experimental field (INIFAP-Uxmal) conditions. <sup>5</sup>HR: highly resistant; R: resistant; PR: partially resistant; S: susceptible.



**Figure 3.3.1.** Phytotoxic damage caused by the hydrophilic phytotoxic metabolite **F5b** (3%) on banana leaves. **a)** Leaves of four-month-old banana plants growing in pots under greenhouse conditions (CICY). (1) Tuu Gia (HR); (2) Malaccensis CICY (HR); (3) Malaccensis Selangor (HR); (4) Datil (Pisang lili) (R); (5) Grande naine (S); (6) Macho chifle (S); (7) Dominico Hartón (S); (8) Manzano (S). **b)** Leaves of banana field plants (collected at INIFAP-UXMAL experimental field). (1) Calcuta 4 (HR); (2) Pisang Awak (R); (3) J.D. Yangambi (R); (4) Fougamou (PR); (5) Saba (PR); (6) Niyama Yik (S). Both sterile uninoculated medium and water were used as controls. Damaged tissue around the wound (necrosis and chlorosis) was quantified using a foliar area measurer (Li-COR, Lincoln; Nebraska, USA Li-3100). To determine significant differences between treatments, results were analyzed using a one-way ANOVA test and P-values of < 0.05 were considered significant. Each experiment was run with four replicates per treatment and repeated at least twice. HR: highly resistant; R: resistant; PR: partially resistant; S: susceptible.

It has been reported that the toxicity of the lipophilic phytotoxins of *M. fijiensis*, e.g. the effect of juglone at the chloroplast level, is light-dependent (Balint-Kurti & Churchill, 2004; Busogoro *et al.*, 2004a,b). This coincides with the observations in the field, where the symptoms of the disease are less strong in banana and plantain plants growing in the shade suggest a light-dependence of the disease and point to the photosynthetic apparatus as the possible site of action of the phytotoxins of *M. fijiensis* (Carlier *et al.*, 2000; Busogoro *et al.*, 2004a,b). However, testing of the different hydrophilic fractions and metabolites of *M. fijiensis* on banana leaves of *M. acuminata* cv. Grande naine showed that the phytotoxic damage was similar under both natural light and darkness conditions (Fig. 3.3.2), indicating that the phytotoxicity of these metabolites is not light-dependent, and excluding the photosynthetic apparatus as their possible site of action.

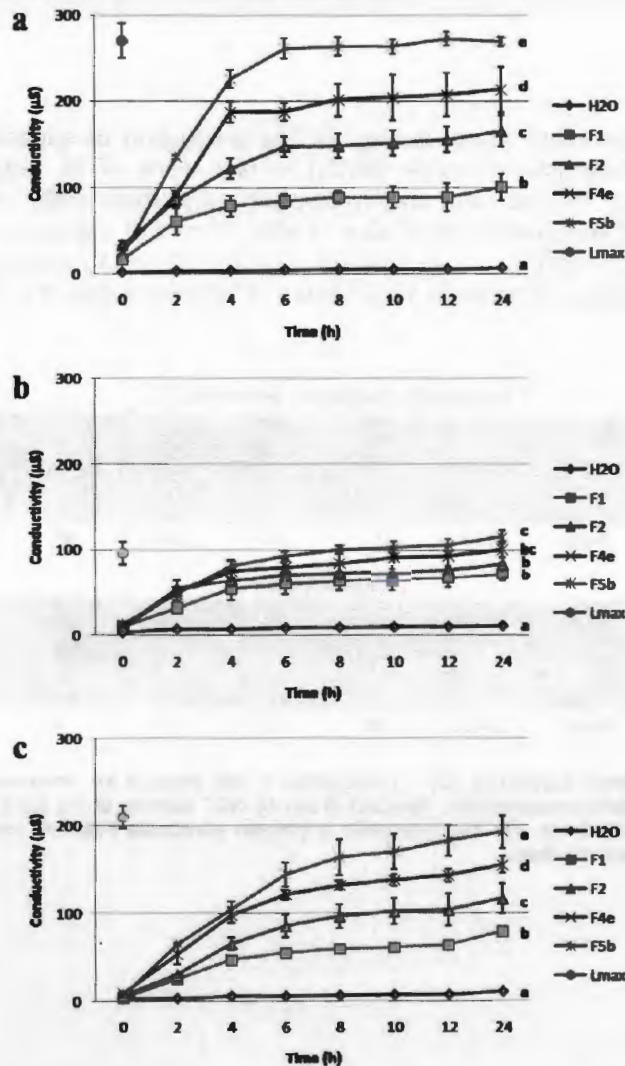


**Figure 3.3.2.** Phytotoxic damage caused by hydrophilic phytotoxic metabolite **F5b** and the semi-purified fractions of *M. fijiensis* (3%) on banana leaves from *M. acuminata* cv. Grande naine growing in pots under greenhouse conditions (CICY). **a)** Phytotoxic damage on leaves of plants kept under natural light. **b)** Phytotoxic damage on leaves of plants kept in the dark. Both sterile uninoculated medium and water were used as controls. Damaged tissue around the wound (necrosis and chlorosis) was quantified using a foliar area measurer (LI-COR, Lincoln; Nebraska, USA LI-3100).

It is known that phytotoxins can exert their effects by inhibiting specific enzymes, by interfering with plant defense responses, or by disrupting the structure and function of the plasma membrane and subcellular organelles (Strange, 2007). The phytotoxic metabolites can affect the integrity of the plasma membrane directly (e.g. by having a specific protein as a target) or indirectly [e.g. as a consequence of the enhanced production of reactive oxygen species (ROS)] and, in many fungal diseases, phytotoxins can induce programmed cell death (PCD) to facilitate the invasion of the host (Wang *et al.*, 1996; Govrin & Levine, 2000; Markham & Hille, 2001; Wolpert *et al.*, 2002, Howlett, 2006; Yakimova *et al.*, 2009). At the same time, it is known that in many plant–pathogen interactions, plant defense includes the hypersensitive response (HR), whereby an oxidative burst induced by the plant generates ROS that are associated with PCD of host cells (Howlett, 2006; Walz *et al.*, 2008). Although the HR is one of the most important factors in impeding the growth of biotrophic pathogens, it does not seem to protect plants against attack by necrotrophic and hemibiotrophic pathogens, which can derive nutrition from the dead host tissue (Oliver & Solomon, 2004; Howlett, 2006; Van-Kan, 2006).

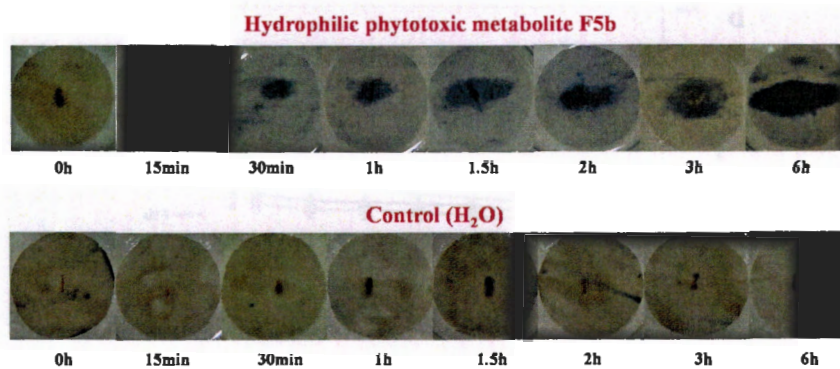
Testing of the different hydrophilic phytotoxic fractions and metabolites of *M. fijiensis* for their effect on the permeability of the plasma membrane of black Sigatoka-susceptible (Grande naine) (Fig. 3.3.3a), partially resistant (Fougamou) (Fig. 3.3.3b), and highly resistant (Tuu Guia) (Fig. 3.3.3c) banana varieties, showed similar levels of electrolyte leakage for the three genotypes. These results pointed to the plasma membrane as a possible site of action for the hydrophilic phytotoxins of *M. fijiensis*, and confirmed their classification as non-HSTs.





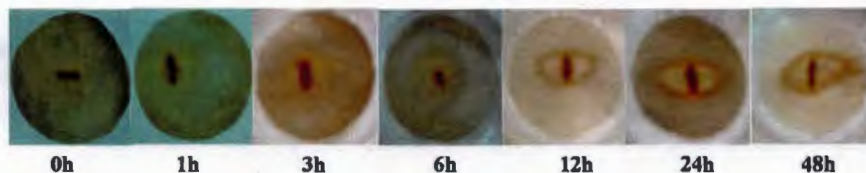
**Figure 3.3.3.** Cell membrane damage (electrolyte leakage assay) caused by hydrophilic phytotoxic metabolite F5b and the semi-purified fractions of *M. fijiensis* (2%) on leaf discs of four-month-old banana plants growing in pots under greenhouse conditions (CICY). a) *M. acuminata* cv. Grande naine (black Sigatoka-susceptible); b) *M. acuminata* cv. Fougamou (black Sigatoka-partially resistant); c) *M. acuminata* cv. Tuu Guia (black Sigatoka-highly resistant). Cell membrane damage was related to changes in conductivity resulting from a 24 h exposure of the leaf discs to the hydrophilic phytotoxins of *M. fijiensis*. The conductivity of the supernatant was measured every two hours (up to a maximum of 24 h) using a conductivity meter. The maximum leakage (Lmax) was established by sterilizing twenty discs in 15 mL of deionized water and measuring the conductivity of the supernatant. To determine significant differences between treatments, results were analyzed using a one-way ANOVA test and P-values of < 0.05 were considered significant. Each experiment was run with three replicates per treatment and repeated at least twice.

On the other hand, testing for the production of superoxide anion ( $O_2^{\bullet -}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in leaf discs of *M. acuminata* cv. Grande naine treated with the hydrophilic phytotoxin **F5b**, showed the generation of superoxide anion ( $O_2^{\bullet -}$ ) after 15 min of exposure and until 6 hours of treatment (Fig. 3.3.4), whereas the production of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) was detected between 12-48 hours of treatment (Fig. 3.3.5).



**Figure 3.3.4.** Anion superoxide ( $O_2^{\bullet -}$ ) production in leaf discs of *M. acuminata* cv. Grande naine (black Sigatoka-susceptible), detected *in situ* by NBT staining of the plant material after different treatment times with the hydrophilic phytotoxin metabolite **F5b**. All treatments were repeated at least three times.

### Hydrophilic phytotoxic metabolite F5b



### Control (H<sub>2</sub>O)



**Figure 3.3.5.** Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production in leaf discs of *M. acuminata* cv. Grande naine (black Sigatoka-susceptible) detected *in situ* by DAB staining of the plant material after different treatment times with the hydrophilic phytotoxin metabolite F5b. All treatments were repeated at least three times.

These results lend support to the hypothesis that oxidative damage might be involved in the action of *M. fijiensis* toxins (Busogoro *et al.*, 2004b) and the fact that production of ROS is important to the establishment and development of the infection of necrotrophic and hemibiotrophic pathogens (Oliver & Solomon, 2004; Howlett, 2006; Van-Kan, 2006). Furthermore, these results are in agreement with the role of ROS during the action of non-HSTs such as juglone on many plant species (Daub, 1986; Remotti *et al.*, 1997; Heiser *et al.*, 1998; Daub & Eherenshaft, 2000), including its role in initiating the oxidation of ascorbic acid (Busogoro *et al.*, 2004b), and its causing induction of ROS production in black Sigatoka-partially resistant (Fougamou) and susceptible (Grande naine) banana plants (El Hadrami *et al.*, 2005). Additionally, it has been reported that cercosporin, the phytotoxin produced by many *Cercospora* spp., when activated by light in the presence of oxygen, elicits the production of singlet oxygen and superoxide (Daub & Hangarter, 1983; Daub *et al.*, 2000) and that both, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* (Tiedemann *et al.*, 1997; Deighton *et al.*, 1999; Govrin & Levine, 2000) induce ROS production by their corresponding hosts. Furthermore, it has been shown that enhanced ROS production in the host is correlated with increased virulence of *B. cinerea* and *S. sclerotiorum* (Tiedemann *et al.*, 1997; Deighton *et al.*, 1999; Govrin & Levine, 2000; Govrin & Levine, 2002).

The results obtained during this investigation suggests that the generation of ROS induced directly or indirectly by the hydrophilic phytotoxic metabolite F5b, might be involved in the establishment of *M. fijiensis* and in the development of the infection in banana plants. This is the first report on

the mechanism and site of action of the hydrophilic phytotoxins produced by *M. fijiensis* and one that, on discussing the possible role of these phytotoxic metabolites in the infectious process, contributes to a better understanding of the role of natural products in the *Musa* spp.-*M. fijiensis* interaction.

### 3.3.5 ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by Project 2004-168 SAGARPA-CONACyT. The authors wish to thank Cecilia Mónica Rodríguez-García and Leticia Peraza-Echeverría (UBT-CICY) for providing the certified strain of *M. fijiensis* (C-1233), Araceli Arreola-Cortés and Ernesto García-Pineda for providing the chemicals (IIQB-UMSNH), Jairo Torres-Martínez and Alberto Mayo-Mosqueda for establishing the *in vitro* cultures of banana plants, and Claudia González-Salvatierra for technical assistance.

### 3.3.6 REFERENCES

- Arreola-Cortés, A., E. Castro-Mercado., E. Lozoya-Gloria and E. García-Pineda (2007). *Capsidiol production in pepper fruits (Capsicum annuum L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70, 69-76.
- Balint-Kurti, P. and A. C. L. Churchill (2004). "Towards a molecular understanding of *Mycosphaerella/banana* interactions", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, Enfield, NH, USA. pp. 147-159.
- Ballio, A. (1991). *Non-host-selective phytotoxins: Biochemical aspects of their mode of action*. *Experientia*, 47, 783-790.
- Busogoro, J. P., J. J. Etamé., G. Harelimana., G. Lognay., J. Messiaen., P. Lepoire and P. van Cutsem (2004a). "Experimental evidence for the action of *M. fijiensis* toxins on banana photosynthetic apparatus", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, USA. pp. 161-170.
- Busogoro, J. P., J. J. Etamé., G. Lognay., J. Messiaen., P. van Cutsem and P. Lepoire (2004b). "Analysis of the mechanisms of action *Mycosphaerella fijiensis* toxins during the development of black leaf streak disease", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, USA. pp. 171-181.
- Carlter, J., E. Fouré., F. Gauhl., D. R. Jones., P. Lepoivre., X. Mourichon., C. Pasberg-Gauhl and R. A. Romero (2000). "Fungal Diseases of the Foliage", in *Diseases of banana, abacá and ensent*, Jones, D. R. (ed). CABI Publishing, New York, USA. pp. 1-4, 37, 72-75.
- Cruz-Cruz, C. A., K. García-Sosa., F. Escalante-Erosa and L. M. Peña-Rodríguez (2009). *Production of hydrophilic phytotoxins by Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of General Plant Pathology*, 75(3), 191-195.
- Daub, M. E. (1986). *Tissue culture and the selection of resistance to pathogens*. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 159-186.

- Daub, M. E. and M. Ehrenshaft (2000). *The photoactivated Cercospora toxin cercosporin: contribution to plant disease and fundamental biology*. Annual Review of Phytopathology, 38, 491-513.
- Daub, M. E. and R. P. Hangarter (1983). *Light induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin*. Plant Physiology, 73, 855-857.
- Daub, M. E., M. Li., P. Bilski and C. F. Chignell (2000). *Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: a possible defense against cercosporin phototoxicity in Cercospora*. Photochemistry and Photobiology, 71, 135-140.
- Deighton, N., I. Muckenschnabel., B. A. Goodman and B. Williamson (1999). *Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of Capsicum annuum by Botrytis cinerea*. The Plant Journal, 20, 485-492.
- El Hadrami, A. E., D. Kone and P. Lepoivre (2005). *Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to black leaf streak disease*. European Journal of Plant Pathology, 113, 241-254.
- Govrin, E. M. and A. Levine (2000). *The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea*. Current Biology, 10, 751-757.
- Govrin, E. M. and A. Levine (2002). *Infection of Arabidopsis with a necrotrophic pathogen, Botrytis cinerea, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR)*. Plant Molecular Biology, 48, 267-276.
- Harelimana, G., P. Lepoivre., H. Jijakli and X. Mourichon (1997). *Use of Mycosphaerella fijiensis toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak*. Euphytica, 96, 125-128.
- Heiser, I., W. Obwald and E. F. Elstner (1998). *The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins*. Plant Physiology and Biochemistry, 36, 703-713.
- Hoss, R., J. Helbig and H. Bochow (2000). *Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (Musa spp.-Mycosphaerella fijiensis)*. Journal of Phytopathology, 148, 387-394.

- Howlett, B. J. (2006). *Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi*. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 371-375.
- Jeng-Sheng, H. (2001). *Plant Pathogenesis and resistance: Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. pp. 292-383.
- Knoche, H. and J. P. Duvick (1987). "The role of fungal toxins in plant disease", in *Fungal Infection of Plants. Symposium of the British Mycological Society*. Pegg G. F. and P. G. Ayres (eds). Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney. pp. 158-192.
- Lepoivre, P., J. P. Busogoro., A. El Hadrami., J. Carlier., G. Harelimana., X. Mourichon., B. Panis., A. Stella-Riveros., N. Roux., G. Sallé., H. Strosse and R. Swennen (2002). "Banana-*Mycosphaerella fijiensis* (black leaf streak disease) interactions" in *Proceeding of the Second International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas*, INIBAP San José, Costa Rica. pp. 20-23.
- Markham, J. E. and J. Hille (2001). *Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions*. *Molecular Plant Pathology*, 2(4), 229-239.
- Mitchell, R. E. (1984). *The relevance of non-host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens*. *Annual Review of Phytopathology*, 22, 215-245.
- Oliver, R. P. and P. S. Solomon (2004). *Does the oxidative stress used by plants for defense provide a source of nutrients for pathogenic fungi?* *Trends of Plant Science*, 9, 472-473.
- Prell, H. H. and P. R. Day (2000). *Plant-Fungal Pathogen Interaction: A Classical and Molecular View*. Springer, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapore, Tokio. pp. 57-64.
- Remotti, P. C., H. J. M. Löffler and L. V. Vloten-Doting (1997). *Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus x grandiflorus* cv. "Peter Pears"*. *Euphytica*, 96, 237-245.
- Scheffer, R. and R. Livingston (1984). *Role of toxins in evolution and ecology of plant pathogenic fungi*. *Toxicology*, 100, 17-21.

- Strange, R. N. (2003). *Introduction to Plant Pathology*. John Wiley & Sons, Ltd., London, UK. pp. 205-240.
- Strange, R. N. (2007). *Phytotoxins produced by microbial plant pathogens*. *Natural Product Reports*, 24,127-144.
- Stierle, A. A., R. Upadhyay., J. Hershenhorn., G. A. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains*. *Experientia*, 47, 853-858.
- Thordal-Christensen, H., Z. Zhang., Y. Wei and D. B. Collinge (1997). *Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction*. *The Plant Journal*, 11, 1187-1194.
- Tiedemann, A. V. (1997). *Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 151-166.
- Upadhyay, R. K., G. A. Strobel., S. J. Coval and J. Clardy (1990). *Fijiesin, the first phytotoxin from M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease*. *Experientia*, 46, 982-984.
- Van-Kan, J. (2006). *License to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen*. *Trends of Plant Science*, 11, 247-253.
- Walton, J. D. (1996). *Host-Selective toxins: Agents of compatibility*. *The Plant Cell*, 8, 1723-1733.
- Walz, A., I. Zingen-Sell., S. Theisen and A. Kortekamp (2008). *Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 317-330.
- Wang, H., J. Li., R. Bostock and D. Gilchrist (1996). *Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by host-selective phytotoxin and invoked during development*. *The Plant Cell*, 8, 375-391.
- Wolpert, T. J., L. D. Dunkle., L. M. Ciuffetti (2002). *Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name?* *Annual Review of Phytopathology*, 40, 251-285.



Yakimova, E. T., Z. P. Yordanova., S. Slavov., V. M. Kapchina-Toteva and E. J. Woltering (2009). *Alternaria alternata* AT Toxin Induces Programmed Cell Death in Tobacco. *Journal of Phytopathology*, 157, 592-601.



## CAPÍTULO 4

### Discusión general

Tomando en cuenta la importancia de las fitotoxinas como factores de virulencia durante el proceso infeccioso, y que su aislamiento y caracterización contribuye al conocimiento de la interacción planta-patógeno, el objetivo principal de este estudio fue llevar a cabo la purificación biodirigida e identificación de metabolitos fitotóxicos hidrofílicos producidos por *M. fijiensis*, con el fin de evaluar su selectividad y su sitio de acción.

Durante este trabajo se establecieron dos estrategias de purificación para la obtención de fitotoxinas hidrofílicas presentes en el filtrado acuoso de cultivos de *M. fijiensis*, una por HPLC (Cruz-Cruz *et al.*, 2009) y otra utilizando métodos tradicionales de purificación; este último permitió la purificación de la fracción fitotóxica H con mayor rapidez y mejor rendimiento.

El análisis por LC-MS de la fracción fitotóxica H mostró un componente mayoritario de bajo peso molecular impar (429 uma), sugiriendo la posible presencia de un átomo de nitrógeno en su estructura (Silverstein *et al.*, 1981). Las fragmentaciones secuenciales del ion molecular mostraron la pérdida sucesiva de una unidad de pentosa ( $C_5H_8O_4$ ) y otra de hexosa ( $C_6H_{10}O_5$ ), y una aglicona residual de 136 uma. La estructura de la fitotoxina hidrofílica correspondiente al componente principal de la fracción H está en proceso de identificación final.

La evaluación de la selectividad de la fracción fitotóxica H sobre hojas de bananos (*Musa* spp.) con diferentes grados de susceptibilidad y resistencia a la Sigatoka negra indicaron que no existe una correlación directa entre la actividad fitotóxica detectada en las hojas y el correspondiente nivel de resistencia y susceptibilidad de las plantas a la enfermedad. Por lo anterior, y tomando en cuenta los criterios de clasificación para las fitotoxinas (Knoche & Duvick, 1987; Prell & Day, 2000), las fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis* corresponden a no-HST's. Estos resultados difieren con los reportados en la literatura, en donde la actividad fitotóxica de extractos y fitotoxinas lipofílicas aisladas de *M. fijiensis*, está directamente relacionada a la resistencia y susceptibilidad observada para las diferentes variedades en campo (Molina & Krausz, 1989; Stierle *et al.*, 1991; Busogoro *et al.*, 2004a,b).

Por otra parte, y aun cuando en la literatura se reporta que la actividad fitotóxica de las fitotoxinas de *M. fijiensis* es dependiente de la luz, sugiriendo al aparato fotosintético como sitio de acción (Busogoro *et al.*, 2004a y b; Balint-Kurti & Churchill, 2004; Carlier *et al.*, 2000), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la actividad fitotóxica de las diferentes fracciones hidrofílicas y los metabolitos purificados de *M. fijiensis* no son dependientes de la luz.

La mayoría de las fitotoxinas afectan la estructura y función de la membrana plasmática y de los organelos subcelulares, además de las actividades enzimáticas (Strange, 2007). Los efectos de las fitotoxinas sobre la integridad de la membrana plasmática pueden ser directos (e.g. teniendo a una proteína específica como blanco) o indirectos (e.g. teniendo como consecuencia un aumento en la producción de ROS). Aun cuando la generación de ROS es característica de una respuesta de defensa de la planta hacia el patógeno, se ha reportado que para el caso de fitopatógenos necrotrofos y hemibiotrofos (e.g. *M. fijiensis*), la producción de ROS está asociada con el establecimiento del patógeno y con el subsecuente desarrollo de la infección (Wang *et al.*, 1996; Govrin & Levine, 2000; Oliver & Solomon, 2004; Howlett, 2006; van Kan, 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el sitio de acción de los metabolitos fitotóxicos hidrofílicos de *M. fijiensis* es la membrana plasmática. Por otra parte, la evaluación de los mismos metabolitos fitotóxicos en plantas de banano con diferentes grados de resistencia y susceptibilidad a la Sigatoka negra, demostró que no existe correlación entre la capacidad de los metabolitos para afectar la membrana plasmática y los diferentes niveles de resistencia y susceptibilidad de las plantas a la enfermedad. Lo anterior confirmó la clasificación de los metabolitos fitotóxicos hidrofílicos de *M. fijiensis* como no-HST's.

Finalmente, la producción de ROS ( $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ ) en discos de hojas de banano, inducida por la fracción fitotóxica **H** de *M. fijiensis*, apoya la hipótesis de que el mecanismo de acción de las fitotoxinas de *M. fijiensis* involucra un daño oxidativo (Busogoro *et al.*, 2004b), y los reportes que describen la producción de ROS como importante, y en algunos casos particulares necesaria, para el establecimiento y desarrollo de organismos hemibiotrofos (e.g. *M. fijiensis*) y necrotrofos durante el proceso infeccioso (Govrin & Levine, 2000; Oliver & Solomon, 2004; Howlett, 2006; van Kan, 2006).

Los resultados anteriores coinciden con los reportados en la literatura, e.g. la generación de ROS ha sido reportada durante la acción de juglona en plantas de banano con diferentes grados de resistencia y

susceptibilidad a la Sigatoka negra (El Hadrami *et al.*, 2005), en tanto que la cercosporina, una fitotoxina no-HST producida por *Cercospora* spp. (anamorfo de *M. fijiensis*), elicit la producción de ROS como mecanismo de acción cuando es activada por la luz en presencia de oxígeno (Daub & Hangarter, 1983; Daub *et al.*, 2000).

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo indican que *M. fijiensis* produce fitotoxinas hidrófilas no-HST's y que su efecto fitotóxico no es dependiente de la luz. Adicionalmente los resultados indican que el sitio de acción de estos metabolitos es la membrana plasmática y que la inducción de ROS forma parte del mecanismo de acción del fitopatógeno durante su establecimiento e infección de plantas de banano y plátanos.

## 4.1 BIBLIOGRAFÍA

- Balint-Kurti, P. and A. C. L. Churchill (2004). "Towards a molecular understanding of *Mycosphaerella*/banana interactions", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, Enfield, NH, USA. pp. 147-159.
- Busogoro, J. P., J. J. Etamé., G. Harelimana., G. Lognay., J. Messiaen., P. Lepoire and P. van Cutsem (2004a). "Experimental evidence for the action of *M. fijiensis* toxins on banana photosynthetic apparatus", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, USA. pp. 161-170.
- Busogoro, J. P., J. J. Etamé., G. Lognay., J. Messiaen., P. van Cutsem and P. Lepoire (2004b). "Analysis of the mechanisms of action *Mycosphaerella fijiensis* toxins during the development of black leaf streak disease", in *Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations*, Mohan, S. and R. Swennen (eds). Science Publisher, USA. pp. 171-181.
- Carlier, J., E. Fouré., F. Gauhl., D. R. Jones., P. Lepoivre., X. Mourichon., C. Pasberg-Gauhl and R. A. Romero (2000). "Fungal Diseases of the Foliage", in *Diseases of banana, abacá and ensent*, Jones, D. R. (ed). CABI Publishing, New York, USA. pp. 1-4, 37, 72-75.
- Cruz-Cruz, C. A., K. García-Sosa., F. Escalante-Erosa and L. M. Peña-Rodríguez (2009). *Production of hydrophilic phytotoxins by Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of General Plant Pathology*, 75(3), 191-195.
- Daub, M. E. (1986). *Tissue culture and the selection of resistance to pathogens*. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 159-186.
- Daub, M. E. and M. Ehrenshaft (2000). *The photoactivated Cercospora toxin cercosporin: contribution to plant disease and fundamental biology*. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 491-513.
- Daub, M. E. and R. P. Hangarter (1983). *Light induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin*. *Plant Physiology*, 73, 855-857.

- Daub, M. E., M. Li., P. Bilski and C. F. Chignell (2000). *Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: a possible defense against cercosporin phototoxicity in Cercospora*. Photochemistry and Photobiology, 71, 135-140.
- El Hadrami, A. E., D. Kone and P. Lepoivre (2005). *Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to black leaf streak disease*. European Journal of Plant Pathology, 113, 241-254.
- Govrin, E. M. and A. Levine (2000). *The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea*. Current Biology, 10, 751-757.
- Heiser, I., W. Obwald and E. F. Elstner (1998). *The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins*. Plant Physiology and Biochemistry, 36, 703-713.
- Howlett, B. J. (2006). *Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi*. Current Opinion in Plant Biology, 9, 371-375.
- Knoche, H. and J. P. Duvick (1987). "The role of fungal toxins in plant disease", in *Fungal Infection of Plants. Symposium of the British Mycological Society*. Pegg G. F. and P. G. Ayres (eds). Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney. pp. 158-192.
- Molina, G. C. and J. P. Krausz (1989). *A phytotoxic activity in extracts of broth culture of Mycosphaerella fijiensis Morelet var. difformis and its use to evaluate host resistance to black Sigatoka*. Plant Disease, 73, 142-143.
- Oliver, R. P. and P. S. Solomon (2004). *Does the oxidative stress used by plants for defense provide a source of nutrients for pathogenic fungi?* Trends of Plant Science, 9, 472-473.
- Prell, H. H. and P. R. Day (2000). *Plant-Fungal Pathogen Interaction: A Classical and Molecular View*. Springer, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapore, Tokio. pp. 57-64.
- Remotti, P. C., H. J. M. Löffler and L. V. Vloten-Doting (1997). *Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from Gladiolus x grandiflorus cv. "Peter Pears"*. Euphytica, 96, 237-245.

- Silverstein, B. and Morrill (1981). *Spectrometric identification of organic compounds*. Fourth Edition, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. pp. 3-43.
- Stierle, A. A., R. Upadhyay., J. Hershenhorn., G. A. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of M. fijiensis, the causative agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains*. *Experientia*, 47, 853-858.
- Strange R. (2007). *Phytotoxins produced by microbial plant pathogens*. *Natural Product Reports*, 24,127–144.
- Van-Kan, J. (2006). *License to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen*. *Trends of Plant Science*, 11, 247-253.
- Wang, H., J. Li., R. Bostock and D. Gilchrist (1996). *Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by host-selective phytotoxin and invoked during development*. *The Plant Cell*, 8, 375-391.



## CAPÍTULO 5

### Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo generaron nuevos conocimientos en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*, e.g la producción de fitotoxinas de naturaleza hidrofílica como nuevo factor de virulencia por parte del fitopatógeno. Sin embargo, es de particular interés lograr la identificación final de la estructura de la fitotoxina hidrofílica correspondiente al componente principal de la fracción H; una vez establecida la estructura química, se podrían llevar a cabo estudios de estructura-actividad que permitan identificar el o los grupos responsables de la actividad detectada.

Para profundizar en el estudio del sitio y mecanismo de acción de los metabolitos fitotóxicos hidrofílicos producidos por *M. fijiensis*, y el papel que juegan durante el proceso infeccioso, sería conveniente utilizar cultivos de células en suspensión de banano para evaluar los efectos de los metabolitos fitotóxicos hidrofílicos a nivel celular y otros niveles (e.g. ADN). La elucidación de estos mecanismos, y la caracterización de los metabolitos y enzimas involucradas en estos procesos, permitirán establecer una perspectiva más clara del papel que juegan estas fitotoxinas en la interacción *Musa* spp.-*M.fijiensis*. Estos resultados permitirían conocer mejor las bases moleculares que determinan la resistencia y susceptibilidad de las plantas de banano y plátano a la Sigatoka negra y permitirían diseñar o establecer nuevas estrategias para el control y prevención de la enfermedad.

