

# **MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Evaluación de la actividad fitotóxica en cultivos de  
*Mycosphaerella fijiensis* Morelet mediante el uso de  
diferentes técnicas de bioensayo**

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

**Mario Alfonso Puch Ceh**

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

**Mérida, Yucatán, México  
2001**



## **Agradecimientos**

Antes que nada y a nadie a esa fuerza poderosa que nos guía a diario y que gracias a ella me ha permitido salir adelante junto a mi adorado hijo "Mario" y mi querida amiga, compañera y esposa "Xóchitl".

En la integración de este trabajo de tesis, la participación del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, el Dr. Ángel Trigos Landa y el Dr. Cuauhtemoc Navarro Mastache fue de gran ayuda por su infinita paciencia y sus atinadas sugerencias y correcciones.

También agradezco de manera muy especial al M. C. Alberto Mayo Mosqueda por enseñarme eficientemente las diferentes técnicas en el cultivo de *Musa* spp.

Expreso mi gratitud a las autoridades del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y hacer uso de sus instalaciones, así como la beca otorgada por la misma para concluir mi tesis. De igual forma, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de este trabajo de investigación.

Finalmente, quiero agradecer a todas y cada una de las personas que de una forma u otra colaboraron para llevar a cabo mis metas.



## Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATPasa	Adenintrifosfatasa
BAP	Bencilaminopurina
CZAPEK	Medio de levadura Czapek
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
HST	Toxinas específicas de huésped
no-HST	Toxinas no específicas de huésped
IBA	Infusión de banano y azúcar
MeOH	Metanol
MNS	Medio nutritivo sintético
MS	Murashige-Skoog
PDA	Agar de papa y dextrosa
PDB	Caldo de papa y dextrosa
ROS	Especies reactivas de oxígeno



## Contenido

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
<b>Capítulo 1 Uso de las fitotoxinas</b>	<b>9</b>
Uso de las fitotoxinas en investigación	9
Uso de las fitotoxinas en la agricultura	10
Fitotoxinas como herramientas en los procesos de selección	10
Bibliografía	13
<b>Capítulo 2 Mecanismos de respuesta vegetal</b>	<b>17</b>
Interacción hospedero-parásito	17
Hipótesis gene-gene	17
Interacción hospedero-patógeno	17
Mecanismos de defensa vegetal	17
Respuesta hipersensible (HR)	17
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	18
Fortificación de la pared celular	18
Proteínas relacionadas con la patogénesis (PROTEINAS PR)	19
Lipooxigenasas (LOX)	19
Fitoalexinas	19
Bibliografía	21
<b>Capítulo 3 Generalidades</b>	<b>25</b>
Generalidades del género <i>Musa</i>	25
Descripción botánica	25
Importancia del cultivo de <i>Musa</i>	25
Limitantes en el cultivo de <i>Musa</i>	25
Alternativas para el cultivo de <i>Musa</i>	26
Descripción general de la enfermedad Sigatoka Negra y del agente causal	26

	Descripción del agente causal	26
	Origen de la Sigatoka Negra en México	27
	Descripción de síntomas	27
	Fitotoxinas de <i>M. fijiensis</i> Morelet.	28
	Función de las fitotoxinas de <i>M. fijiensis</i> en la patogénesis	28
	Uso de las fitotoxinas de <i>M. fijiensis</i> en estudios de selección	28
	Bibliografía	31
<b>Capítulo 4</b>	<b>Evaluación de las condiciones óptimas de cultivo en medio líquido del hongo <i>M. fijiensis</i> Morelet.</b>	<b>35</b>
	Introducción	35
	Materiales y métodos	35
	Obtención de cepas	35
	Preparación de cultivos padres	35
	Preparación de semilla	36
	Evaluación de medios de cultivo en condiciones estacionarias	36
	Evaluación de medios de cultivo en condiciones de agitación	37
	Resultados y discusión	37
<b>Capítulo 5</b>	<b>Establecimiento de las metodologías para las diferentes técnicas de bioensayo.</b>	<b>41</b>
	Introducción	41
	Materiales y métodos	41
	Material vegetal	41
	Bioensayos	42
	Bioensayo de gota	42
	Método de punción	42
	Método de incisión	42
	Bioensayo de fuga de electrolitos	43
	Método 1	43
	Método 2	43



	Bioensayo de infiltración	43
	Resultados y discusión	44
<b>Capítulo 6</b>	<b>Evaluación de los filtrados crudos fitotóxicos correspondientes en los diferentes bioensayos.</b>	
	Introducción	51
	Materiales y métodos	51
	Preparación de filtrado	51
	Preparación de los extractos orgánicos	51
	Material vegetal	52
	Fuga total de electrolitos	52
	Resultados y discusión	53
	Bibliografía	59
	<b>Discusión</b>	<b>61</b>
	<b>Conclusiones y perspectivas</b>	<b>63</b>
	<b>Apéndice I</b>	<b>65</b>
	<b>Apéndice II</b>	<b>67</b>
	<b>Apéndice III</b>	<b>69</b>



## Resumen

Dos de los prerequisites necesarios para la selección de genotipos resistentes a enfermedades son el contar con variabilidad genética y con un procedimiento confiable que permita la identificación de plantas resistentes. En el caso particular de la enfermedad foliar de *Musa* conocida como Sigatoka Negra, causada por el fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*, aun cuando se ha reportado el uso de cultivo de tejidos para la obtención de variabilidad genética, la falta de un procedimiento confiable para la identificación de las variedades resistentes a la enfermedad ha impedido el éxito de los programas de selección establecidos.

Como objetivo de este proyecto se planteó la evaluación de diferentes técnicas de bioensayo para la selección de variedades de *Musa* resistentes a la Sigatoka Negra y la optimización de las condiciones de cultivo de *M. fijiensis* que permitieran obtener un mayor rendimiento de extracto crudo y una máxima expresión de fitotoxicidad. Para la detección de la actividad fitotóxica se utilizaron los bioensayos de gota, de fuga de electrolitos y de infiltración. En tanto que para el cultivo del hongo se evaluaron diferentes medios definidos e indefinidos, con y sin infusión de banano a dos regímenes de luz y en condiciones estacionarias y de agitación. Los resultados mostraron que el cultivo del hongo en el medio V-8 sin infusión, cultivado en condiciones de agitación y de fotoperíodo 12/12, resulta en una mayor expresión de fitotoxicidad aun cuando su rendimiento de extracto orgánico crudo fue menor al de los demás medios evaluados.

Por otra parte, la evaluación de las diferentes técnicas de bioensayo mostraron que no existe una correlación directa entre la susceptibilidad o resistencia de las plantas y los resultados obtenidos *in vitro* haciendo uso de los filtrados fitotóxicos. Lo anterior sugiere que la falta de evidencia experimental sobre el papel que desempeñan las fitotoxinas de *M. fijiensis* en el desarrollo de la Sigatoka Negra, es un punto primordial para la selección de variedades resistentes a la enfermedad. Es necesario entonces, el desarrollo de nuevos proyectos encaminados a la elucidación estructural de los metabolitos fitotóxicos y al establecimiento de su papel en el proceso infeccioso.



## Abstract

Two prerequisites for the selection of resistant genotypes to plant fungal diseases are genetic variability and a reliable procedure for the identification of disease-resistant plants. In the particular case of the foliar disease of *Musa* known as Black Sigatoka, caused by the phytopathogen *Mycosphaerella fijiensis*, even though the use of plant tissue culture has been reported for obtaining genetic variability, the lack of a reliable procedure for the identification of disease-resistant varieties has prevented the success in establishing selection programs.

The objectives of this project included the evaluation of different bioassay techniques for the selection of *Musa* varieties resistant to Black Sigatoka and the optimization of the culture conditions of *M. fijiensis*, so as to obtain a high yield of crude extract and a maximum expression of phytotoxic activity. Three bioassays; leaf drop, electrolyte leakage and infiltration, were evaluated for the detection of phytotoxicity. Fungal growth conditions were optimized evaluating defined and undefined media, each with and without banana-leaf infusion, under two light treatments, comparing still and shake conditions. The results showed that culturing the fungus in V-8 juice medium, without banana leaf infusion, under shake conditions, and a 12/12 photoperiod, resulted in maximum expression of phytotoxicity, even though the yield of the organic extract was lower than that obtained from other media.

On the other hand, the evaluation of the different bioassay techniques showed that there is no direct correlation between the susceptibility or resistance of the plants to the disease in the field and the results obtained in the laboratory using the phytotoxic filtrates. This suggests that the lack of experimental evidence on the role played by the phytotoxins of *M. fijiensis* during the development of Black Sigatoka, is an important aspect for the selection of resistant varieties to the disease. It is necessary then, to develop new projects directed towards the structural elucidation of the phytotoxic metabolites and the establishment of their role in the infectious process.

+



## Introducción

La suposición de que ciertos "factores químicos" están involucrados en las enfermedades vegetales causadas por microorganismos patogénicos data desde mediados del siglo XIX. Durante mucho tiempo, la función de estos "factores químicos" en la patogénesis vegetal permaneció en controversia debido a la inhabilidad de los investigadores para llevar a cabo su purificación y caracterización, limitando con esto la interpretación de los experimentos biológicos.

La importancia del estudio de estos "factores químicos", ahora denominados fitotoxinas, fue demostrada en dos royas epidémicas causadas por hongos del género *Helminthosporium* que devastaron enormes extensiones de cultivo de avena y maíz durante la década de los setentas en los Estados Unidos y por fitopatógenos del género *Alternaria* en pera y manzana en Japón (1,2). En cada una de estas epidemias, los efectos destructivos de los patógenos fueron atribuidos directamente a la acción de sus fitotoxinas, demostrándose la existencia de una relación directa entre la producción de estos compuestos por el microorganismo y su capacidad para infectar la planta. Estos conocimientos proporcionaron entonces la justificación económica necesaria para que se iniciaran los primeros trabajos de investigación (2,3). Desde entonces, los fitopatólogos han utilizado las fitotoxinas para estudiar las bases moleculares de resistencia y susceptibilidad en plantas, en tanto que los químicos se han interesado en caracterizar sus estructuras químicas y los biólogos y agrónomos las han reconocido como herramientas útiles en los programas de fitomejoramiento.

Ahora se sabe que tanto los patógenos bacterianos como los fúngicos producen fitotoxinas dañinas al hospedero vegetal en bajas concentraciones y éstas pueden difundirse desde el sitio de infección hacia los tejidos adyacentes. Las fitotoxinas se han definido, entonces, como productos de bajo peso molecular que pueden causar necrosis, clorosis, marchitamiento o una combinación de estos síntomas en un hospedero susceptible (4) y se han clasificado como específicas (HST) y no específicas (no-HST), de acuerdo a su participación en el proceso de infección en la planta. Las HSTs son consideradas determinantes primarios de la patogenicidad, ya que son requeridas por el patógeno para colonizar la planta;

estas toxinas sólo afectan a plantas de genotipos susceptibles y a bajas concentraciones reproducen los síntomas de la infección natural. Los cultivos resistentes al patógeno no son dañados, incluso a altas concentraciones por estas fitotoxinas. Las no-HSTs existen en un número mayor que las HSTs y aunque estos metabolitos no reproducen los patrones de resistencia y susceptibilidad del hospedero al patógeno, juegan un importante papel en la expresión de virulencia de la enfermedad. En este último grupo están incluidas todas las fitotoxinas bacterianas y la mayoría de las toxinas fúngicas (4,5,6).

Dada la importancia del papel que desempeñan en el proceso de infección, las HSTs han sido objeto de un mayor número de investigaciones. Esto ha resultado en el establecimiento de una serie de criterios para que una fitotoxina sea considerada como tal, entre éstos se incluyen: 1) que ésta sea un producto metabólico de un microorganismo patogénico y que sea tóxica únicamente a las plantas hospederas del hongo; 2) que el patógeno muestre un paralelismo cuantitativo entre su capacidad para producirla y su capacidad para causar infección; 3) que la planta sea igualmente susceptible a la infección y a la fitotoxina; 4) que la fitotoxina reproduzca todos los síntomas y respuestas bioquímicas observadas durante la infección; y 5) que la fitotoxina sea producida durante la germinación de las esporas del patógeno (2).

Todas las HSTs, excepto la toxina Ptr, son metabolitos secundarios pertenecientes a diferentes grupos de estructuras químicas, tales como policétidos, péptidos cíclicos, terpenoides, sacáridos y productos de biogénesis incierta. Hasta la fecha se han documentado 20 HSTs (Tabla 1), la mayoría de las cuales son producidas por especies o patotipos de 2 géneros, *Alternaria* y *Cochliobolus* (también conocido por el nombre antiguo y actual de su etapa imperfecta, *Helminthosporium* o *Bipolaris*, respectivamente). Otras HSTs bien documentadas son la toxina PM producida por *Phyllosticta maydis* (*Mycosphaerella zea-maydis*), la peritoxina producida por *Periconia circinata* y la toxina Ptr producida por *Pyrenophora tritici-repentis* (7).

Entre las principales aplicaciones de las fitotoxinas se incluye su utilización como sondas para comprender mejor los procesos involucrados en la interacción hospedero-patógeno. En fisiología vegetal, estos metabolitos han sido empleados para mejorar el conocimiento de procesos bioquímicos y fisiológicos, tales como



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 (6).

Tabla 1. Fitotoxinas específicas de huésped (HSTs)

PATOGENO	HOSPEDERO	TOXINA
<i>Alternaria mali</i>	Manzana	AM I, II y III
<i>A. tenuissima</i>	Chicharo	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. kekuchiana</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>Cochliobolus carbonum</i> r.1	Maíz	HC I, II y III
<i>C. heterostrophus</i> r. 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>Periconia circinata</i>	Sorgo	PERITOXINA



## Capítulo 1

### Uso de las fitotoxinas

Además de su importancia en el campo de la patología vegetal, en la que han sido utilizadas como reguladores potenciales en los procesos bioquímicos y genéticos que ocurren durante el desarrollo normal de la infección en especies vegetales, las fitotoxinas han sido utilizadas también como supresores e inductores de respuestas de defensa y actualmente representan un modelo importante para el desarrollo de herbicidas biodegradables y como agentes de selección *in vitro* de líneas de plantas resistentes a enfermedades .

#### Uso de las fitotoxinas en investigación.

Un ejemplo de una fitotoxina que actúa como supresora de los mecanismos de defensa vegetal es la fitotoxina AK, producida por *Alternaria kekuchiana*. Este metabolito suprime los mecanismos de defensa en hojas de pera, demostrándose que estos mecanismos son inducidos por una glucoproteína producida por las esporas del patógeno al momento de su germinación (1).

En la literatura se encuentran numerosos ejemplos en los que el uso de las fitotoxinas ha permitido descifrar algunos de los procesos bioquímicos involucrados en su mecanismo de acción. Por ejemplo, se ha demostrado que la fitotoxina CBT o beticolina 1, producida por *Cercospora beticola*, inhibe el transporte de protones dependiente de ATP en vesículas microsomales de tallos de guisantes y de raíces de maíz (2-4). Por otra parte, el uso de alternasol A, una fitotoxina no-HST producida por *Alternaria solani* y otros patógenos (e.g. *A. pomi*, *Dactylaria lutea*, *Phomopsis juniperivora* y *Stemphylium botryosum*); ha permitido establecer que su mecanismo de acción consiste en estimular la oxidación de NADH mitocondrial; lo anterior resulta en la generación de aniones superóxido y, trae como consecuencia, la peroxidación lipídica, el daño al ADN y la oxidación de tioles (5). El hongo *Fusicoccum amygdali*, patógeno de durazno y almendro, produce fusicoccina, una no-HST que activa la enzima ATPasa de la membrana plasmática. Esta activación provoca la entrada de  $K^+$  y otros cationes, así como de  $Cl^-$  y agua, a las células guarda estomáticas; lo que acarrea una apertura irreversible del estoma y por tanto, la aparición del marchitamiento típico de la enfermedad en las hojas (6). Otros estudios llevados a cabo con fusicoccina han

permitido establecer que la activación de ATPasa presente en la membrana plasmática está mediada por la unión de la fusicoccina a su receptor (7-13).

#### **Uso de las fitotoxinas en agricultura.**

En la agricultura, algunas fitotoxinas producidas por patógenos son consideradas como agentes prometedores en el control biológico de especies vegetales no deseables. Las ventajas de utilizar estos compuestos para el control biológico de malezas están dadas por la facilidad para producir y almacenar estos metabolitos, así como los aspectos económicos y de seguridad para el agricultor y el medio ambiente (14-16). Una de las principales fitotoxinas con posible utilidad como herbicida natural es la bipolaroxina, producida por *Cochliobolus cynodontis*, patógeno fúngico del zacate Bermuda (*Cynodon dactylon*), maleza que crece comúnmente junto a especies vegetales de importancia económica. Se ha descrito que la bipolaroxina a una concentración de 38  $\mu\text{M}$  causa lesiones sobre el zacate Bermuda; mientras que en avena, caña de azúcar y maíz, es necesario aplicar concentraciones más altas (0.7mM) para observar daño (17). Por otra parte, se ha observado también que algunas malezas son susceptibles a las no-HSTs de diferentes patógenos, aún cuando éstas no sean hospederas del patógeno que produce las fitotoxinas. Como ejemplo de lo anterior, se puede mencionar el caso de la dihidropirenoforina, producida por *Pyrenophora avenae*, agente causal de la mancha de la hoja de avena, la cual causa lesiones en su hospedero a concentraciones de  $10^{-4}$  M; sin embargo, a concentraciones inferiores a  $6.5 \times 10^{-8}$  M induce lesiones en zacate Johnson (*Sorghum halepense*) (17).

#### **Fitotoxinas como herramientas en los procesos de selección.**

Una de las aplicaciones más recientes de las fitotoxinas es su utilización como herramientas en procesos de selección *in vitro* de líneas de plantas resistentes a enfermedades; particularmente aquéllas causadas por hongos, las cuales constituyen una de las principales causas de pérdidas en los cultivos. Hasta ahora la propagación epidémica de enfermedades fúngicas ha sido controlada comúnmente de tres maneras: a) aplicación de técnicas de cultivo, tales como la rotación de cultivos, la prevención de la propagación de suelos infestados y la prevención del acarreo de material vegetal infectado; b) la producción de cultivos resistentes a hongos y c) la aplicación de fungicidas (18-21). El primero es un proceso que consume tiempo y que requiere de trabajo

intensivo, así como de grandes áreas de terreno. Por otra parte, y aún cuando el control químico con fungicidas ha demostrado ser útil, éste es un procedimiento costoso que eventualmente llega a ser menos eficiente debido a la evolución del patógeno. Por lo anterior, el desarrollo de cultivos resistentes a enfermedades representa una alternativa importante para el control de enfermedades fúngicas, donde la utilización de la variabilidad genética inherente del cultivo y un procedimiento confiable para identificar genotipos resistentes constituyen dos de los requisitos necesarios para lograrlo. Sin embargo, en la producción tradicional de plantas resistentes a enfermedades (evaluación en campo) existen varios inconvenientes, tales como la falta de variabilidad genética, el alto costo del proceso, la desigual presión de inóculo, así como el tiempo y el espacio requerido para la selección de poblaciones bajo estudio.

Los problemas mencionados anteriormente pueden ser superados mediante la multiplicación *in vitro* de plantas resistentes, ya sea por cultivo de células o de tejidos vegetales, procedimiento que ha demostrado su potencial para producir una variabilidad sustancial por sí misma (variación somaclonal) (22,23). Lo anterior resulta en una mayor variabilidad genética, una reducción en los costos y la manipulación de millones de plantas potenciales en un espacio mínimo. La importancia de las fitotoxinas radica en su utilización para recuperar materiales que resulten resistentes a las mismas.

Aún cuando el uso de las fitotoxinas en los procesos de selección ofrece un enorme potencial, es importante considerar aspectos como las condiciones en que se lleva a cabo este proceso para contar con un sistema efectivo. Como ejemplo de lo anterior, se puede mencionar el hecho de que mientras una selección efectiva para resistencia a tabtoxina requiere que los tejidos de tabaco crezcan en luz para aislar variantes resistentes a tentoxina, se requiere que el tratamiento con la fitotoxina sea en la oscuridad, seguido por exposición a la luz del tejido tratado (18). El primer sistema de selección *in vitro* estudiado fue tabaco, donde se reportó que plantas regeneradas a partir de protoplastos habían sido seleccionadas usando un análogo de la fitotoxina de *Pseudomonas tabaci* (metionina sulfoximina) (24). Desde entonces varios intentos han sido descritos en la literatura y se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Sistemas de selección *in vitro* para el aislamiento de variantes resistentes.

PLANTA	PATOGENO	MATERIAL FITOTOXICO UTILIZADO
<i>Oryza sativa</i> (25)	<i>Helminthosporium oryzae</i>	Filtrado
<i>Avena sativa</i> (26)	<i>Helminthosporium victoriae</i>	Fitotoxina AV
<i>Lycopersicon esculentum</i> (27)	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> raza 3	Filtrado
<i>Medicago sativa</i> (28)	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Medicaginis</i>	Filtrado
<i>Avena sativa</i> (29)	<i>Helminthosporium sativum</i>	Filtrado
<i>Brassica napus</i> (30)	<i>Phoma lingam</i>	Fitotoxina (Sirodesmina PL)

## Bibliografia

1. **Kohmoto, K.** (1987) Recent advances in studies of host-specific toxins with special reference to *Alternaria* toxins. *J. Plant Pathol.* **3**, 43-53.
2. **Gomès, E., Simon-Plas, F., Milat, M.L., Gapillout, I., Mikes, V., Pugin, A. and Blein, J.P.** (1996) *Cercospora beticola* toxins. IX Relationship between structure of beticolins, inhibition of plasma membrane H<sup>+</sup> - ATPase and partition in lipid membranes. *Physiol. Plant.* **98**, 133-139.
3. **Macri, F., Vianello, A., Cerana, R. and Rasi-Caldagno, F.** (1980) Effects of *Cercospora beticola* toxins on ATP level of maize roots and on the phosphorylating activity of isolated pea mitochondria. *Plant Sci. Lett.* **18**, 207-214.
4. **Macri, F., Dell' Antone, P., and Vianello, A.** (1983) ATP-dependent proton uptake inhibited by *Cercospora beticola* toxin in pea stem microsomal vesicles. *Plant Cell Environ.* **6**, 555 - 558.
5. **Haraguchi, H., Abo, T., Fukuda, A., Okamura, N. and Yagi, A.** (1996) Mode of phytotoxic action of altersolanols. *Phytochemistry* **43**, 989 - 992.
6. **Turner, N. C. and Graniti, A.** (1969) Fusicoccin, a fungal toxin that opens stomata. *Nature* **223**, 1070 - 1071.
7. **Blein, J-P., Bourdil, I., Rossignol, M. and Scalla, R.** (1988) *Cercospora beticola* toxin inhibits vanadate-sensitive H<sup>+</sup> transport in corn root membrane vesicles. *Plant Physiol.* **88**, 429 - 434.
8. **Feyerabend, M. and Weiler, E. W.** (1988) Characterization and localization of fusicoccin-binding sites in leaf tissues for the fungal wilt-inducing toxin fusicoccin. *Planta* **174**, 115 - 122.
9. **Ballio, A., Federico, R., Pessi, A. and Scalcibi, D.** (1984) Fusicoccin binding sites in subcellular preparations of spinach leaves. *Plant Sci. Lett.* **18**, 39 - 44.
10. **De Michelis, M. I., Pugliarello, M. C. and Rasi- Caldugno, F.** (1989) Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H<sup>+</sup> - ATPase. I.- Characteristics and intracellular localization of the fusicoccin receptor in microsomes from radish seedlings. *Plant Physiol.* **90**, 133 - 139.
11. **Meyer, C., Feyerabend, M. and Weiler, E. M.** (1989) Fusicoccin-binding proteins in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. Characterization, solubilization and photoaffinity labelling. *Plant Physiol.* **89**, 692 - 699.

12. **Stout, R. G. and Cleland, R. E.** (1980) Partial characterization of fusicochin binding sites on oat root membranes. *Plant Physiol.* **66**, 353 - 359.
13. **Stout, R. G.** (1988) Fusicochin activity and binding in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **88**, 999 - 1001.
14. **TeBeest, D. O. and Templeton, G. E.** (1985) Mycoherbicides: Progress in the biological control of weeds. *Plant Disease* **69**, 6 - 10.
15. **Hoagland, R. E.** (1990) in *Microbes and Microbial Products as Herbicides* (Hoagland, R. E., ed.) pp. 2 – 52. American Chemical Society, Washington, D.C.
16. **Templeton, G. E.** (1982) Biological herbicides: discovery, development, deployment. *Weed Sci.* **30**, 430 - 433.
17. **Strobel, G., Kenfield, D., Bunkers, G., Sugawara, F. and Clardy, J.** (1991) Phytotoxins as potential herbicides. *Experientia* **47**, 819 - 827.
18. **Jones, P. W.** (1990) in *Plant Cell Line Selection* (Dix, J. P., ed.) pp. 113-149. VCH, Federal Republic of Germany.
19. **Cornelissen, B.J.C. and Melchers, L. S.** (1993) *Plant Physiol.* **101**, 709.
20. **Baker, R. and Scher, F. M.** (1987) in *Innovative Approaches to Plant Disease Control* (Chet, I., Wiley, J. And Sons eds.) pp. 1 – 19 USA.
21. **Buiatti, M. and Ingram, D. S.** (1991) Phytotoxins as tools in breeding and selection of disease-resistant plants. *Experientia* **47**, 811 - 819.
22. **Gavazzi, G., Tonelli, C., Todesco, G., Arrighini, F., Raffaldi, F., Sala, F., Biasini, M. G., Vecchio, F. and Barberi, F.** (1987) Chemically induced mutagenesis versus somaclonal variation in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **74**, 773 - 779.
23. **Sheperd, K., Loyola, J. L. and Alves, J.** (1986) en *Mejoramiento Genético de Banano y Plátano en Brasil y Honduras*. pp. 1 –19. UPEB, Panamá.
24. **Carlson, P. S.** (1973) Methionine-sulfoximine resistant mutants of tobacco. *Science* **180**, 1366 - 1368.
25. **Ling, D. H., Vidhyaseharan, P., Borromeo, E. S., Zapata, F. J. and Mew, T. W.** (1985) *In vitro* screening of rice germplasm for resistance to brown-spot disease using phytotoxin isolated from *Helminthosporium oryza*. *Theor. Appl. Genet.* **71**, 133 - 135.



26. **Rines, H. K. and Luke, H. H.** (1985) Selection and generation of toxin insensitive plants from tissue cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium victoriae*. *Theor. Appl. Genet.* **71**, 16 - 21.
27. **Shahin, E. A. and Spivey, R.** (1986) A single dominant gene for *Fusarium* wilt resistance in protoplast derived tomato plants. *Theor. Appl. Genet.* **73**, 164 - 169.
28. **Arcioni, S., Pezzoti, M. and Damiani, F.** (1987) *In vitro* selection of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. *medicagines*. *Theor. Appl. Genet.* **74**, 700 - 705.
29. **Chawla, H. S. and Wenzel, G.** (1987) *In vitro* selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum*. *Theor. Appl. Genet.* **74**, 841 - 845.
30. **Sjödín, C. And Glimelius, K.** (1989) Differences in response to the toxin sirodesmin PL produced by *Phoma lingam* (Tode) Desm. on protoplasts, cell aggregates and intact plants of resistant and susceptible *Brassica* accessions. *Theor. Appl. Genet.* **77**, 76 - 80.



## Capítulo 2

### Mecanismos de respuesta vegetal

#### Interacción hospedero-parásito.

##### Hipotesis gene-gene.

El reconocimiento del patógeno específico de raza resulta de la interacción directa o indirecta entre el gene dominante o semidominante de resistencia vegetal (gene *r*) y el correspondiente gene dominante de avirulencia del patógeno (gene *avr*). Esta interacción desencadena eventos de transducción de señales que, se asume, coordina la activación de una amplia gama de respuestas de defensa (1-4).

#### Interacción hospedero-patógeno.

Existen 3 razones para una interacción incompatible entre el hospedero y el patógeno (5) :

- 1) La planta es incapaz de aportar los requerimientos para un patógeno potencial y, por lo tanto, no es hospedera.
- 2) La planta posee barreras estructurales o metabolitos tóxicos que evitan la infección de especies de patógenos especializados.
- 3) Al reconocer el ataque de un patógeno, la planta desencadena mecanismos de defensa para limitar la invasión.

#### Mecanismos de defensa vegetal.

##### Respuesta hipersensible (HR).

Hipersensibilidad se define como la muerte localizada de células del hospedero alrededor del sitio de contacto del patógeno con el fin de limitar la invasión (6). Se ha propuesto que la HR desempeña un papel crucial en la resistencia vegetal (5-7), particularmente en interacciones entre plantas y patógenos biotróficos obligados que forman haustorio con las células del hospedero; en este caso, la muerte celular priva al patógeno de los nutrientes necesarios. En interacciones que involucran patógenos hemibiotróficos y necrotrofos, la función de HR es menos clara, debido a que estos patógenos pueden obtener nutrientes de las células muertas. Sin embargo, se cree que la descompartmentalización en las células muertas puede permitir la liberación de sustancias tóxicas preformadas que están almacenadas en la vacuola (8).

### **Especies reactivas de oxígeno (ROS).**

Las especies reactivas de oxígeno: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical oxhidrilo ( $OH^{\cdot}$ ) y radical hidroperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), se producen en interacciones compatibles e incompatibles y sirven como agentes de ataque específico al ADN, como moléculas señal y como degradadoras de la membrana celular, entre otros papeles. En estos casos la producción de ROS puede resultar dañina tanto para el hospedero como para el patógeno infectante (9-11).

En estudios recientes en cultivos de células vegetales, se ha demostrado que las plantas poseen mecanismos para la producción de  $O_2^{\cdot-}$  que involucran una NADPH oxidasa similar a la encontrada en neutrófilos de mamíferos. El  $O_2^{\cdot-}$  generado es rápidamente dismutado a  $H_2O_2$ , y puesto que el  $H_2O_2$  no tiene electrones desapareados, puede cruzar membranas biológicas mientras que especies cargadas como  $O_2^{\cdot-}$  lo hacen muy lentamente. Tanto  $O_2^{\cdot-}$  como el  $H_2O_2$  son especies moderadamente reactivas, por lo tanto, el daño celular por ROS es debido a su conversión en especies más reactivas como el  $HO_2^{\cdot}$  y  $OH^{\cdot}$  (12 – 19).

### **Fortificación de la pared celular.**

El mecanismo de fortificación de la pared celular aumenta la resistencia a patógenos en varias formas. Mientras que para los biótropos extracelulares, como *Cladosporium fulvum*, este proceso impide la fuga de contenido citoplasmático, reduciendo así la disponibilidad de nutrientes para el patógeno; para los necrótrofos, tales como *Botrytis cinerea*, este mecanismo retarda la difusión de toxinas y enzimas a las células vegetales sensibles. Por otra parte, los precursores fenólicos de la lignina, así como los ROS producidos durante las reacciones de polimerización en la pared celular, pueden afectar la plasticidad de la membrana del patógeno o inactivar su producción de enzimas, toxinas o inductores (20 – 23).

### **Proteínas relacionadas con la patogénesis (Proteínas PR).**

Las proteínas PR se definen como proteínas localizadas intra- y extracelularmente que se acumulan en tejidos vegetales intactos o células en cultivo, después del ataque de un patógeno o del tratamiento con inductores, respectivamente (24). Varias proteínas PR, incluyendo quitinasas, glucanasas o de unión a quitina, poseen actividad antifúngica o antibacteriana *in vitro*. Es posible que las actividades de estas proteínas esté basada en su capacidad para degradar o alterar estructuralmente los polisacáridos estructurales de la pared celular fúngica (25, 26).

### **Lipooxigenasas (LOX).**

Son enzimas que pueden generar moléculas señal, tales como el ácido jasmónico (JA), el metil jasmonato o los peróxidos lipídicos, los cuales pueden coordinar la amplificación de respuestas específicas. La actividad de LOX puede causar daño irreversible a la membrana, la cual permite la fuga de contenido celular y que da finalmente lugar a la muerte celular (6,26-28). Alternativamente, las reacciones catalizadas por LOX pueden estar involucradas en la producción de tóxicos volátiles y metabolitos secundarios derivados de ácidos grasos, que podrían atacar directamente al patógeno invasor (28).

### **Fitoalexinas.**

Las fitoalexinas se definen como metabolitos antimicrobianos de bajo peso molecular que son sintetizados y acumulados en las plantas cuando éstas son expuestas a condiciones de estrés o a inductores bióticos o abióticos (29,30). Estos productos se diferencian claramente de otros metabolitos antimicrobianos, los cuales son preformados o formados directamente a partir de precursores inactivos. Actualmente se considera que las fitoalexinas son agentes de gran importancia en la expresión de la resistencia vegetal. Se ha demostrado que la capacidad para degradar las fitoalexinas del hospedero está relacionada con la alta virulencia del correspondiente patógeno invasor o infectante. Las líneas generales de evidencia que relacionan a las fitoalexinas con la expresión de resistencia son las siguientes (31-34):

- 1) Plantas genéticamente resistentes, comparadas con variedades susceptibles, producen invariablemente altos niveles de fitoalexinas.
- 2) La producción de supresores de fitoalexinas por parte del patógeno induce una disminución en la resistencia.

- 3) El uso de inhibidores químicos para la síntesis de proteínas o de inhibidores de enzimas en la ruta biosintética de fitoalexinas da lugar a una resistencia disminuida.
- 4) El aislamiento de inductores específicos de raza, los cuales reproducen la especificidad en la inducción de fitoalexinas de manera similar al patógeno que las produce.
- 5) La remoción de las fitoalexinas del sitio de infección disminuye la resistencia, mientras que la adición exógena de fitoalexinas la aumenta.
- 6) Las fitoalexinas son sintetizadas en el sitio de ataque, en el tiempo y a la concentración suficiente para inhibir la invasión del patógeno.
- 7) Los patógenos en tejidos vegetales resistentes exhiben anormalidades ultraestructurales similares a las observadas en los mismos patógenos expuestos a fitoalexinas purificadas de cultivos *in vitro*.

## Bibliografía

1. Keen, N. T. (1990) in *Microbes and Microbial Products as Herbicides* (Hoagland, R. E., ed.) pp.114 – 129. American Chemical Society, Washington, D.C.
2. Keen, N. T. (1992) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 447 - 463.
3. De Wit, P. J. G. M. (1982) in *Phytoalexins* (Bailey, J. A. and Mansfield, J. W., eds.) pp.1 – 24. Blackie & Son Ltd, London.
4. Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G. and Jones, J. D. G. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**, 661 - 667.
5. Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773 - 1791.
6. Goodman, R.N. and Novacky, A. J. (1994) *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens* (Goodman, R. N. and Novacky, A. J., eds.) pp. 3 - 74. APS, St. Paul, Minnesota.
7. Holub, E. B., Beynon, J. L. and Crute, I. R. (1994) Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**, 223 - 239.
8. Osbourn, A. E. (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**, 1821 - 1831.
9. Doke, N. (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* **23**, 359 - 367.
10. Doke, N., and Ohshi, Y. (1988) Involvement of an  $O_2^-$  generating system in the induction of necrosis lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.*, **32**, 163 - 175.
11. Apostol, I., Low, P. S. and Heinstejn, P. (1989) Effect of cell age suspension cultures on susceptibility to a fungal elicitors. *Plant Cell Rep.* **7**, 692 - 695.
12. Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. (1994)  $H_2O_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583 - 593.
13. Murphy, T. M. and Auth, C.-K. (1996) The superoxide synthases of plasma membrane preparations from cultured rice cells. *Plant Physiol.*, **110**, 621 - 629.

14. **Segal, A. W. and Abo, A.** (1993) The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biol. Sci.* **18**, 43 - 47.
15. **Groom, Q. J., Torres, M. A., Fordham-Skelton, A. P., Hammond-Kosack, K. E., Robinson, N. J. and Jones, J. D. G.** (1996) *Rboh A*, a rice homologue of the mammalian *gpq1* phox respiratory burst oxidase gene. *Plant J.* **10**, 515 - 522.
16. **Sutherland, M. W.** (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**, 79 - 93.
17. **Mehdy, M. C.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* **105**, 467 - 472.
18. **Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449 - 460.
19. **Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.** (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1 - 85.
20. **Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A. J.** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**, 203 - 212.
21. **Farmer, E. E. and Ryan, C. A.** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**, 129 - 134.
22. **Heath, M. C.** (1980) Reaction of nonsusceptible to fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**, 211 - 236.
23. **Bayles, C. J., Ghemawat, M. S. and Aist, J. R.** (1990) Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation, papillae deposition and resistance to powdery mildew in an *mlo* barley mutant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **36**, 63 - 72.
24. **Bowles, D. J.** (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 873 - 907.
25. **Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., and Vad, K.** (1993) Plant chitinases. *Plant J.* **3**, 31 -40.
26. **Hoagland, R. E.** (1990) in *Microbes and Microbial Products as Herbicides* (Hoagland, R. E., ed.) pp. 87 -113. ASC, Washington.
27. **Keppler, L. D., and Novacky, A.** (1986) Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathol.* **76**, 104 - 108.



28. **Croft, K. P. C., Jüttner, F. and Slusarenko, A. J.** (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol.* **101**, 13 - 24.
29. **Paxton, J.** (1980) A new working definition of the term phytoalexin. *Plant Disease* **64**, 734.
30. **Smith, C. J.** (1996) Accumulation of phytoalexins: Defense mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* **132**, 1 - 45.
31. **Bailey, J. A.** (1974) The relationship between symptom expression and phytoalexin concentration in hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.* **4**, 477 - 488.
32. **Doke, N., Nakae, Y. and Tomiyama, K.** (1976) Effect of blasticidin S on the production of rishitinin potato tuber tissue infected by a compatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* **12**, 133 - 139.
33. **Hahn, M. G., Bonhoff, A. and Grisebach, H.** (1985) Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. Sp. *Glycinea*. *Plant Physiol.* **77**, 591 - 601.
34. **Mayama, S., Tani, T., Matsuura, Y., Ueno, T. and Fukami, H.** (1981) The production of phytoalexins by oat in response to crown rust *Puccinia coronata* f. sp. *Avenae*. *Physiol. Plant Pathol.* **19**, 217 - 226.



## Capítulo 3

### Generalidades

#### Generalidades del género *Musa*.

##### Descripción botánica.

El género *Musa* está representado por monocotiledóneas herbáceas perennes altas, con tallo subterráneo grueso. El verdadero tallo aéreo terminal del cormo es la inflorescencia, una espiga larga pedunculada, con poco tejido de sostén que se mantiene erecta por las vainas de las hojas y que, en algunos casos, se dobla al alcanzar el tamaño de fructificación. En la fase vegetativa, el pseudotallo resulta del crecimiento de las vainas y las láminas foliares que se superponen. Las hojas se desarrollan a partir del meristemo terminal del tallo subterráneo y están separadas por entrenudos cortos; presentan una vaina tubular gruesa, un peciolo largo y una imponente lámina foliar lanceolada, con vena central prominente y venación pinada densa curvada hacia los márgenes, fusionándose entre ellas para formar una vena marginal (1,2). Los nuevos tallos aéreos surgen de yemas laterales del "cormo" (ahijamiento). La duración del ciclo vegetativo es de alrededor de 11-15 meses, dependiendo de las distintas especies, variedades y condiciones ambientales (1).

##### Importancia del cultivo *Musa*.

La relevancia económica de los cultivos de banano (*Musa acuminata*, genoma A) y plátano (*M. acuminata* x *M. paradisiaca* y *M. acuminata* x *M. balbisiana*, genoma A x B) radica en su utilización como fuente alimenticia para millones de personas en todo el mundo. Estos cultivos se localizan en cuarto lugar de importancia después del arroz, trigo y maíz y son fuente de productos secundarios útiles, tales como fibras, cerveza, vino y vinagre, y almidón (3,4).

##### Limitantes en el cultivo de *Musa*.

Uno de los principales problemas para la producción de plantas de *Musa* está dado por la falta de semillas o el hecho de que sólo un número limitado de clones diploides producen polen viable, suficiente para la polinización y la posterior producción de semilla en los clones triploides fértiles femeninos (5). Cabe mencionar que todos los cultivares comerciales de bananos (los clones Cavendish) son estériles.

Sin embargo, el factor principal que afecta los niveles de producción en cultivos de *Musa* es la enfermedad foliar conocida como Sigatoka Negra (6), la cual es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que es reconocida como la forma más agresiva del complejo de enfermedades Sigatoka. El complejo Sigatoka incluye 2 patógenos fúngicos estrechamente relacionados: *M. musicola*, agente causal de la Sigatoka amarilla y el *M. fijiensis* Morelet, agente causal de la línea negra de la hoja de plátano o Sigatoka Negra (7). La infección provocada por la Sigatoka Negra da lugar a una reducción en la asimilación de la luz en las hojas, que resulta en una disminución en la capacidad fotosintética de la planta y la maduración prematura de los frutos (8).

Reportes a nivel mundial indican que la Sigatoka Negra provoca una reducción de hasta un 33 % en el rendimiento de la cosecha cuando no se controla. Se calcula que el costo del control de la Sigatoka Negra, mediante la aplicación de fungicidas en América Central, Colombia y México, sobrepasa los 350 millones de dólares en los últimos ocho años, lo que representa un aumento serio en los costos de producción (3).

#### **Alternativas para el cultivo de *Musa*.**

El hecho de que las variedades comerciales comestibles de *Musa* sean triploides, con frutos partenocárpicos y semilla sexual estéril, reduce la variabilidad genética y la posibilidad de hibridación (5). Debido a lo anterior, es difícil aplicar los métodos convencionales de mejoramiento a esta especie. Sin embargo, el uso de la técnica de cultivo de tejidos vegetales (10), combinado con la utilización de fitotoxinas como herramientas de selección (11), ofrece una alternativa importante para la obtención de variedades de *Musa* resistentes a Sigatoka Negra .

#### **Descripción general de la enfermedad Sigatoka Negra y del agente causal.**

##### **Descripción del agente causal.**

El hongo *M. fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra, pertenece a la clase *Ascomycete*, orden *Dothiales*, familia *Dothiaceas*. El género *Mycosphaerella* agrupa aproximadamente 1000 especies, la mayoría saprófitas y algunas de las cuales infectan plantas de importancia económica (10).

Leach describió la morfología del patógeno y propuso la denominación de *Mycosphaerella fijiensis*. En 1976 se reportó una nueva variedad de *M. fijiensis* designada como "*difformis*" al encontrarse esporodoquios y conidióforos simples en los estomas; sin embargo, estudios posteriores permitieron declarar inconsistente esta clasificación. En la actualidad, se denomina *M. fijiensis* al estado sexual y *Paracercospora fijiensis*, al estado asexual del fitopatógeno (12).

La fase asexual del hongo se presenta durante el desarrollo de las primeras lesiones de la enfermedad (pizca, estrías). En esta etapa se observa la presencia de conidióforos con conidios saliendo de los estomas en la superficie inferior de las hojas. En la segunda etapa del desarrollo de la lesión, la producción de conidióforos cesa y se inicia la fase sexual (sobre el primer estado de mancha) del patógeno; ésta se caracteriza por la producción de ascosporas en estructuras llamadas peritecios, formados sobre los estomas de la parte superior (adaxial) e inferior (abaxial) de la mancha foliar (13,14).

#### **Origen de la enfermedad en México.**

El primer reporte de Sigatoka Negra en plantaciones comerciales de banano en México tuvo su origen en los estados de Chiapas y Tabasco en 1981. A partir de esta fecha, la enfermedad se diseminó rápidamente hacia los estados de Veracruz y Oaxaca en 1985. En la región del Pacífico-Centro, la Sigatoka Negra se detectó por primera vez en el estado de Colima en 1989 y un año después, se diseminó a los estados vecinos (Michoacán y Jalisco), reportándose en el estado de Nayarit en 1994 (15,16).

#### **Descripción de síntomas.**

Para facilitar el estudio de la Sigatoka Negra, los síntomas de la enfermedad se han clasificado en seis estadios (3):

Estadio 1: Pequeñas pizcas color pardo rojizo de aproximadamente 0.25 mm<sup>2</sup> sobre la cara inferior de la hoja.

Estadio 2: Primer estado de estría, las pizcas iniciales se alargan y se unen formando estrías de color pardo rojizo paralelas a las venas secundarias.

Estadio 3: Segundo estado de estrías, éstas se alargan y se ensanchan cambiando de pardo rojizo a pardo oscuro o casi negro.

Estadio 4: Primer estado de manchas; las estrías se ensanchan tomando forma elíptica, son de color pardo oscuro y están rodeadas por un halo claro, pardo y acuoso.

Estadio 5: Segundo estado de mancha, con el centro de la lesión ligeramente hundido, de color oscuro, a veces con halo clorótico.

Estadio 6: Centro de la lesión necrosado y hundido; la mancha, de forma bien definida, es rodeada por un halo angosto de color pardo oscuro o negro y éste a su vez, presenta un halo clorótico.

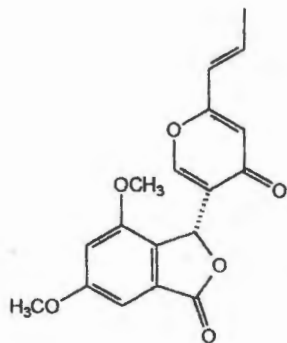
### **Fitotoxinas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.**

#### **Función de las fitotoxinas de *M. fijiensis* Morelet en la patogénesis.**

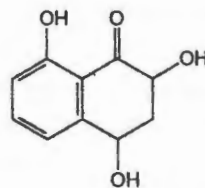
El primer estudio utilizando filtrados crudos de *M. fijiensis* Morelet, describe cómo el área de tejido necrótico observado al tratar siete variedades de *Musa* se relaciona con la sensibilidad a la enfermedad de éstas observada en campo. Por otra parte, al tratar especies vegetales no hospedadas de *M. fijiensis* Morelet con el filtrado crudo no se observa actividad fitotóxica (17). La primera fitotoxina identificada en cultivos *in vitro* de *M. fijiensis* Morelet fue la fijiensina (Fig. 1a), clasificada como una no-HST (18). Posteriormente se reportó el aislamiento de seis metabolitos fitotóxicos (Fig. 1b - g) producidos por *M. fijiensis*. Uno de estos metabolitos, la 2,4,8 - trihidroxitetralona (Fig. 1b), mostró selectividad por el hospedero y una clara actividad diferencial, respetando los patrones de resistencia y susceptibilidad en planta, similares a los observados en campo con el patógeno (19). Lo anterior sugirió la posible designación de la tetralona como la HST producida por *M. fijiensis* Morelet.

#### **Uso de las fitotoxinas de *M. fijiensis* Morelet en los estudios de selección.**

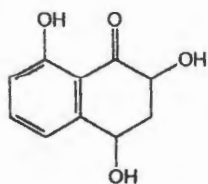
Hasta ahora existe un sólo reporte relacionado con el uso de fitotoxinas para la selección de genotipos resistentes de banano y plátano. En este estudio se emplearon fitotoxinas purificadas y fracciones semipurificadas para la selección de plantas resistentes de *Musa* a partir de suspensiones celulares y callos. Sin embargo, mientras que las plantas regeneradas a partir de callos seleccionados como resistentes no mantuvieron el nivel de resistencia original, el bajo porcentaje de regeneración en las suspensiones celulares impidió realizar las evaluaciones *in vivo* (8).



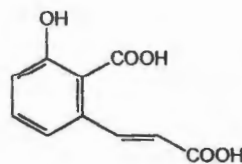
a) fijiensina



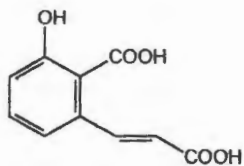
b) 2,4,8-trihidroxitetraona



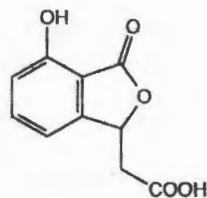
c) juglona



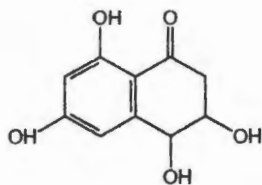
d) ácido-2-carboxi-3-hidroxicinámico



e) ácido dimetil éster-2-carboxi-3-metoxicinámico



f) ácido isocrocinico



g) 3,4,6,8-tetrahidrotetraona

Fig. 1 Metabolitos fitotóxicos producidos por *M. fijiensis*

Un factor limitante de importancia para la obtención de variedades de banano resistentes a Sigatoka Negra, utilizando fitotoxinas como herramientas de selección, está dado por la falta de un procedimiento confiable para la identificación de genotipos resistentes.

La importancia de contar con una metodología de bioensayo para la identificación de genotipos resistentes a *M. fijiensis* Morelet se refleja en dos estudios recientes. El primer estudio se planteó como objetivo principal evaluar el efecto fitotóxico del extracto orgánico crudo, obtenido de filtrados de *M. fijiensis*, sobre hojas de vitroplantas de *Musa* cultivadas en invernadero y sobre cultivos *in vitro* de diferentes variedades con grados variables de resistencia a la enfermedad. El inconveniente principal de este trabajo residió en el hecho de que el uso de callos para la selección de plantas resistentes incrementó la formación de quimeras (12). En el segundo estudio se describió un método para la selección *in vitro* de plantas de banano resistentes a *M. fijiensis* Morelet, usando filtrado fitotóxico crudo del hongo como agente de selección en brotes de *Musa* previamente irradiados con rayos gamma. Los resultados obtenidos permitieron observar diferencias en la respuesta al filtrado fitotóxico después de 30 días. Sin embargo, el largo tiempo necesario para observar los primeros resultados hace inapropiado el uso de esta técnica como una primera metodología en los estudios de selección de plantas de banano resistentes a Sigatoka Negra (20).

Por lo anterior en este proyecto se decidió evaluar diferentes técnicas de bioensayo con el fin de encontrar aquella que permita la obtención de resultados rápidos, reproducibles, cuantitativos y que requiera pequeñas cantidades de muestra para la identificación *in vitro* entre una variedad susceptible, tolerante o resistente.



## Bibliografía

1. **Flores, E.M.** (1989) en *La planta: Estructura y Función*, Editorial Tecnológica de Costa Rica, San José.
2. **Leon, J.** (1987) en *Botánica de los Cultivos Tropicales*, 445 p. Editorial Instituto interamericano de ciencias agrícolas, San José.
3. **Stover, R. H. and Simmonds, N. W.** (1987) *Bananas*, pp. 397-438 Wiley, New York .
4. **Valmayor, R.V.** (1986) in *Bananas and Plantain Breeding Strategies* (Persley, G. D., and DeLanghe, E. A., eds.) pp.50-55. ACIAR, Australia.
5. **Krikorian, A. D. and Cronauer, S.** (1984) in *Handbook of Plant Cell Culture* (Evans, D. A., ed.) pp. 327-348. McMillan Publishing, New York.
6. **Foure, E.** (1986) in *Bananas and Plantain Breeding Strategies* (Persley, G. J., DeLanghe, E. A., eds.) pp. 110-113. ACIAR, Australia.
7. **Stover, R. H.** (1980) Sigatoka leaf spot of banana and plantain. *Plant Disease* **64**, 750 - 755.
8. **Okole, B. N., and Schulz, F. A.** (1997) Selection of *Mycosphaerella fijiensis*-resistant cell lines from micro-cross sections of banana and plantain. *Plant Cell Rep.* **16**, 339.
9. **Robles, H. E., Velázquez, M. F., Ulloa, M. and Delgado, S. S.** (1988) en *La Sigatoka Negra del Plátano en México* (Dir. Gen. De San. y Prot. Agrop. y For., eds.) pp.60. SARH, México.
10. **Escalant, J. V. and Teisson, C.** (1989) in *Sigatoka Leaf Spot Diseases of Bananas Proceedings of an International Network for the Improvement of Banana and Plantain*. pp 338-347. INIBAP, San José.
11. **Robert, M. L. and Loyola, V. M.** (1985) en *El cultivo de tejidos vegetales en México* (CICY,ed.) pp. 1-167. México.
12. **Nuñez, R. H.** (1995) Selección *in vitro* e invernadero de clones de *Musa* sp. para la evaluación de su resistencia a la Sigatoka Negra y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Tesis, Turrialba, Costa Rica.
13. **Mulder, J. L. and Stover, R. H.** (1976) *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. *Transac. Br. Mycol. Soc.* **67**, 77.

14. **Stover, R. H.** (1980) Sigatoka leaf spot of Banana and Plantains. *Plant Disease Reporter* **64**, 750 - 755.
15. **Orozco, S. M. y Ramirez, S. G.** (1991) La sigatoka negra del plátano (*M. fijiensis*) en el estado de Colima. *Rev. Mex. de fitopatología* **9**, 69 - 75.
16. **Orozco, S. M., Vazquez, V. and Orozco, R. J.** (1995) La sigatoka negra (*M. fijiensis*) del plátano en la región del pacífico centro. *Rev. Mex. de fitopatología* **13**, 54-60.
17. **Molina, G. C. and Krausz, J. P.**, (1989) Actividad fitotóxica en extracto de cultivo de *M. fijiensis* y su uso para evaluar patrones de resistencia a sigatoka negra. *Plant Disease* **73**, 142 - 144.
18. **Upadhyay, R. K., Strobel, G. A., Coval, S. J. and Clardy, J.** (1991) Fijiensin, the first phytotoxin from *M. fijiensis*, the causative agent of black sigatoka disease. *Experientia* **47**, 982 - 984.
19. **Stierle, A. A., Upadhyay, R., Hershenthorn, J., Strobel, G. A. and Molina G.** (1991) The phytotoxins of *M. fijiensis*, the causative agent of black sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* **47**, 853 - 858.
20. **García, L.; Herrera, L.; Bermúdez, I.; Veitía, N.; Clavero, J.; Acosta, C. and Romero, C.** (1997) Metodología para la selección in vitro de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en banano. *Bananas*

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la actividad fitotóxica en cultivos de *M. fijiensis* Morelet haciendo uso de diferentes técnicas de bioensayo con el fin de determinar *in vitro* la posible resistencia de variedades de *Musa* frente al agente causal de la Sigatoka Negra.

### Objetivos particulares

- Evaluar las condiciones óptimas de cultivo en medio líquido del hongo *M. fijiensis* Morelet.
- Establecer las metodologías para las diferentes técnicas de bioensayo.
- Evaluar la actividad fitotóxica de los filtrados crudos correspondientes en los diferentes bioensayos.



## Capítulo 4

### Evaluación de las condiciones óptimas de cultivo en medio líquido del hongo *M. fijiensis* Morelet.

#### Introducción

Algunas veces el microorganismo produce, bajo condiciones *in vitro*, metabolitos que no produce *in vivo* o viceversa. Esta variación en la producción de metabolitos secundarios se debe principalmente a las diferencias en las condiciones de cultivo y en las fuentes de nutrientes. En general, los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y desarrollo de hongos *in vitro* son de dos tipos: definidos e indefinidos. En los medios de cultivo indefinidos, las fuentes de carbono y nitrógeno son complejas, ofreciendo la ventaja de proveer una amplia variedad de nutrientes al patógeno, lo que puede en ocasiones resultar en un mayor rendimiento en la producción de metabolitos. Por otro lado, los medios de cultivo definidos se caracterizan por estar constituidos por fuentes de carbono y de nitrógeno especificadas químicamente y, en ocasiones, su uso puede colocar al fitopatógeno en condiciones de estrés favoreciendo así la producción de metabolitos. Los medios definidos poseen la ventaja adicional de que los procesos de purificación se realizan con extractos orgánicos más limpios.

#### Materiales y métodos

##### Obtención de cepas

Ocho cepas de *M. fijiensis* Morelet (GN: I, II, III, IV y W: I, IV, VI Y VII) fueron aisladas por el Dr. Andrew James Kay (CICY, Mérida, Yucatán, México) a partir de plantas infectadas y dos cepas certificadas (269 y 271) fueron proporcionadas por el Dr. X. Mourichon (CYRAD-FLHOR, Montpellier, Francia).

##### Preparación de cultivos "Padre".

Para la preparación de cultivos "padre" de cada una de las cepas ya mencionadas, una porción de micelio de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> fue colocada sobre 10 ml de PDA en tubos de rosca (medida: 18 x 150 mm) inclinados. Los tubos fueron incubados durante 30 días a una temperatura de 26±2° C, bajo condiciones de fotoperiodo 12/12. Terminado el tiempo de incubación, los tubos se guardaron a 4° C hasta su uso.

### **Preparación de “semilla”.**

Dos mililitros de agua destilada estéril se adicionaron al cultivo “padre” de *M. Fijiensis* y con ayuda de una asa microbiológica, la superficie de crecimiento fue raspada ligeramente. Luego se depositó un mililitro del sobrenadante sobre 15 ml de medio PDA contenidos en una caja de Petri. Las cajas se incubaron durante 20 días a una temperatura de 26+/-2° C, bajo condiciones de luz natural. Terminado el periodo de incubación, el inóculo se preparó agregando cinco mililitros de agua destilada estéril sobre la caja que contenía el cultivo y la superficie fue raspada ligeramente con la ayuda de un pincel, tomándose 1 ml del sobrenadante para inocular los correspondientes medios líquidos de cultivo.

### **Procedimiento de evaluación de diferentes medios y condiciones de cultivo.**

#### **Evaluación de diferentes medios en condiciones estacionarias.**

Para la optimización de las condiciones de cultivo de *M. fijiensis* se seleccionaron tres medios indefinidos (V-8, PDB e IBA) y tres definidos (MNS, CZAPEK y M1D), cada uno con y sin infusión de banano (para la preparación de los diferentes medios definidos e indefinidos, ver Apéndices I y II, respectivamente). Se prepararon cuatro frascos Roux conteniendo 250 ml de medio líquido cada uno y tres de los frascos fueron inoculados con 1 ml del inóculo de esporas y micelio de *M. fijiensis*. El frasco restante se dejó sin inocular como control y el pH de los diferentes medios fue medido antes y después del periodo de incubación. Los medios con infusión se prepararon en una relación 1:2 de infusión-medio. Los frascos se incubaron durante 45 días, a una temperatura de 26+/-2° C, bajo dos condiciones de luz: fotoperiodo 12/12 y oscuridad total.

Finalizado el tiempo de incubación, el medio de cultivo fue separado de la masa micelial por filtración a través de dos capas de gasa. El volumen del filtrado crudo colectado de los tres frascos Roux fue ajustado a 750 ml con agua destilada y una parte del filtrado (350 ml) fue liofilizado y redisolto en agua destilada a una concentración de 100 mg/ml; en tanto que 100 ml se congelaron para mantenerlos como control. El resto del filtrado (300 ml) se extrajo con AcOEt, obteniéndose el correspondiente extracto orgánico y la fase acuosa residual.

### **Evaluación de diferentes medios de cultivo en condiciones de agitación.**

Para este estudio se utilizaron los mismos medios definidos e indefinidos mencionados para el estudio de condiciones estacionarias. En este caso se tomaron cuatro matraces Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 300 ml de medio líquido cada uno y tres de los matraces fueron inoculados con 1 ml del inóculo (suspensión de esporas y micelio) de *M. fijiensis* Morelet. El matraz restante se dejó sin inocular como control y el pH de los medios fue medido antes y después del periodo de incubación. Los matraces fueron incubados durante 30 días a una temperatura de 26+/-2°C, bajo condiciones de agitación (100 rpm) y dos regímenes de luz: fotoperiodo 12/12 y oscuridad total.

Finalizado el tiempo de incubación, el medio de cultivo fue separado de la masa micelial por filtración a través de dos capas de gasa. El filtrado crudo colectado de los tres matraces erlenmeyer fue ajustado a 900 ml con agua destilada y una parte del filtrado, 500 ml, fue liofilizado y rediseuelto con agua destilada a una concentración de 100 mg/ml y 100 ml fueron congelados y mantenidos como control. El resto del filtrado (300 ml) fue extraído con AcOEt para obtener el correspondiente extracto orgánico y la fase acuosa residual.

### **Resultados y discusión.**

En experimentos preliminares, realizados con cultivos estacionarios en medio de jugo V-8, se encontró que los filtrados de la cepa WVI presentaban una mayor fitotoxicidad, utilizando el bioensayo de gota. Por esta razón, se decidió utilizar únicamente esta cepa en los experimentos posteriores.

La evaluación de los diferentes medios en condiciones estacionarias y de agitación, mostró que en ambas condiciones, el medio de jugo V-8 registra el mayor crecimiento micelial, seguido por PDB, CZAPEK y M1D. Por otra parte, el MNS no es un medio apto para la propagación del patógeno en condiciones estacionarias, observándose apenas un ligero crecimiento del hongo en este medio.

El rendimiento de los extractos orgánicos crudos de los diferentes tratamientos (determinado por peso) mostró que no existe una relación directa en cuanto a la producción de metabolitos y la cantidad de micelio generado, dado que aún cuando la producción de micelio fue mayor para la mayoría de los cultivos en

medio de jugo V-8, su rendimiento de extracto orgánico crudo resultó ser uno de los de menor proporción. Por el contrario, los cultivos realizados en medio M1D fueron los que produjeron una menor cantidad de micelio y los que registraron la mayor producción de extracto orgánico (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento (mg/l) de los extractos orgánicos crudos de los diferentes medios.

MEDIOS	CONDICIONES DE CULTIVO			
	ESTATICOS		AGITACION	
	FOTOPERIODO	OSCURIDAD	FOTOPERIODO	OSCURIDAD
V-8	21.3	83.0	8.6	11.0
PDB	18.0	9.6	23.6	54.6
M1D	122.6	46.3	69.6	86.3
MNS	-	-	11.3	13.0
CZAPEK	11.0	11.6	12.6	35.3

Al evaluar los filtrados crudos de los diferentes tratamientos mediante el bioensayo de gota, se encontró que los filtrados crudos con mayor actividad fitotóxica fueron los siguientes: CZAPEK en condiciones estacionarias y V-8 en agitación, tanto en condiciones de fotoperíodo 12/12 como oscuridad total. Al reevaluar, mediante el bioensayo de gota, ambos medios y a dos diferentes concentraciones, se encontró que tanto el medio V-8 en condiciones de agitación y el CZAPEK en condiciones estacionarias, ambos bajo condiciones de fotoperíodo 12/12, son los únicos medios que mantienen su actividad fitotóxica en las dos concentraciones evaluadas (Tabla 4).



Tabla 4. Area de lesión de los medios con mayor actividad fitotóxica en cada una de las condiciones evaluadas.

MEDIO	CONDICIONES DE CULTIVO	CONDICIONES DE LUZ	TAMAÑO DE LESION	
			(30 µg/µl)	(15 µg/µl)
V-8	AGITACION	FOTOPERIODO 12/12	1.1824	0.3755
V-8	ESTACIONARIO	FOTOPERIODO 12/12	0.1384	NA
V-8	AGITACION	OSCURIDAD	0.2368	NA
V-8	ESTACIONARIO	OSCURIDAD	0.2067	NA
CZAPEK	AGITACION	FOTOPERIODO 12/12	0.1462	NA
CZAPEK	ESTACIONARIO	FOTOPERIODO 12/12	0.8982	0.2488
CZAPEK	AGITACION	OSCURIDAD	0.2669	NA
CZAPEK	ESTACIONARIO	OSCURIDAD	0.2431	NA

NA = Ninguna actividad

Los medios líquidos con infusión de banano cultivados en condiciones estacionarias no propiciaron el crecimiento micelial en ninguno de los regímenes de luz evaluados. Con el fin de confirmar que en estos casos, la infusión de banano era la responsable de la inhibición del crecimiento del hongo, se decidió realizar un experimento que permitiera detectar la posible presencia de fitoalexinas en la infusión de banano.

Para esto se evaluó la capacidad del liofilizado de la infusión y el correspondiente extracto orgánico crudo de la misma para limitar o inhibir el crecimiento de *M. fijiensis*. Utilizando el método de difusión en agar, los resultados de estos experimentos mostraron que tanto el liofilizado de la infusión como el correspondiente extracto orgánico crudo, evaluados a una concentración del 5 %, inhiben totalmente el crecimiento del hongo. Con base en lo anterior es posible concluir que la infusión de banano contiene uno ó más metabolitos que inhiben el crecimiento del hongo. Esto concuerda con lo reportado en la literatura donde se logró el aislamiento de irenolona y emenolona, identificadas como

fitoalexinas de banano. Sin embargo, en el estudio anterior no se reporta la evaluación de la actividad inhibitoria de las fitoalexinas en el crecimiento de *M. fijiensis*, por lo que estudios posteriores, haciendo uso de las fitoalexinas, podrían corroborar los resultados obtenidos en el presente proyecto.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de *M. fijiensis* requiere de medio de jugo V-8 e incubación en condiciones de agitación y fotoperíodo 12/12. Es importante hacer notar que en la literatura se reporta el medio M1D como el más adecuado para la producción de fitotoxinas de *M. fijiensis* Morelet; sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran una ausencia de actividad fitotóxica en los filtrados de este medio, aún cuando el rendimiento de los extractos orgánicos crudos obtenidos fueron similares a los reportados en la literatura.

Es interesante mencionar también que el mayor rendimiento de los extractos orgánicos no correlaciona con la expresión de una mayor actividad fitotóxica. El medio V-8, en el que se encontró la mayor actividad fitotóxica, resultó ser uno de los medios con menor rendimiento de extracto orgánico crudo; en tanto que, como ya se mencionó anteriormente, el medio M1D, que fue el medio con un mayor rendimiento de extracto orgánico crudo, no mostró actividad fitotóxica.

Experimentos posteriores, encaminados a la elucidación estructural de los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica en los filtrados crudos del medios V-8, permitirá su comparación con aquellos metabolitos reportados como responsables de la actividad fitotóxica en los filtrados crudos del medio M1D.

## Cápitulo 5

### Establecimiento de las metodologías para las diferentes técnicas de bioensayo.

#### Introducción.

Dos de los bioensayos mas comúnmente utilizados para la detección de actividad fitotóxica en filtrados de cultivo y metabolitos purificados son el de gota y el de fuga de electrolitos. El primero es un método confiable que reproduce *in vitro* los mismos síntomas de la infección causados por el patógeno sobre el huésped en el campo; este bioensayo es simple y reproducible, pero se considera como una técnica relativamente cruda ya que no es lo suficientemente sensible ni cuantitativa. Por otra parte, el bioensayo de fuga de electrolitos evalúa el daño ocasionado por las fitotoxinas, a nivel de la membrana, cuantificando la pérdida de solutos; este método permite una mayor sensibilidad, una mejor cuantificación del daño y la obtención de resultados en un tiempo relativamente corto.

#### Materiales y métodos.

##### Material vegetal.

Rizomas de banano (variedad Enano Gigante) colectados en Teapa, Tabasco fueron reducidos, desinfectados, depositados en medio MS suplementado con bencilamino purina (BAP; 3 mg/l) e incubados en la oscuridad para la inducción de brotes. Después de 4 semanas, los frascos Gerber fueron transferidos a condiciones de luz durante ocho días. Terminado este proceso, se inició la fase de multiplicación en medio MS suplementado con BAP (2 mg/l), repitiéndose este proceso cada 15 días.

Para la fase de enraizamiento, las plántulas de mayor tamaño fueron transferidas a cajas magenta que contenían medio MS sin reguladores de crecimiento. Después de tres semanas, las plántulas se transfirieron al invernadero en charolas de plástico para su aclimatación; cuatro semanas más tarde, las plántulas fueron cambiadas a bolsas de plástico negro conteniendo una mezcla de abono-tierra (1:4).

##### Filtrados fitotóxicos

Los filtrados fitotóxicos se obtuvieron como se describen en el capítulo 4.

## **Bioensayos**

Los procedimientos para la realización de los bioensayos se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito en la literatura.

### **Bioensayo de gota**

#### **Método de punción**

La primera o la segunda hoja de plántulas de cuatro y ocho semanas, aclimatadas en invernadero, se escinden y se desinfectan durante un minuto con un desinfectante comercial (Cloralex) al 5 %. A continuación las hojas se enjuagan, se secan y se colocan en una caja de petri estéril conteniendo en el fondo dos capas de papel previamente humedecido con agua. Utilizando un pincel o una asa microbiológica se raspa o punciona, respectivamente, la hoja en tres sitios depositando gotas de 15, 20 y 30  $\mu\text{l}$  de cada uno de los siguientes tratamientos: filtrado crudo, medio sin inocular y agua destilada estéril.

Se utilizan tres hojas por tratamiento y las inoculaciones son llevadas a cabo en la cara adaxial o abaxial. Los recipientes se mantienen bajo condiciones de temperatura ambiente y luz natural y los efectos se registran a las 24, 48, 72 y 96 horas después del tratamiento.

#### **Método de incisión**

La primera o la segunda hoja de plántulas de tres, cuatro y cinco meses, aclimatadas en invernadero, se escinden y se desinfectan durante un minuto con un desinfectante comercial (Cloralex) al 5 %. A continuación las hojas se enjuagan, se secan y se colocan en un recipiente de plástico, previamente desinfectado con etanol al 70 %, conteniendo en el fondo dos capas de papel filtro previamente humedecido con agua. Se realizan 10 incisiones (dos por cada tratamiento) con ayuda de una aguja de disección sobre la cara adaxial o abaxial de la hoja, aplicándose 20  $\mu\text{l}$  de los siguientes tratamientos: filtrado crudo, medio sin inocular y agua destilada estéril.

Se utilizan dos hojas para cada tratamiento y los recipientes son mantenidos bajo condiciones de temperatura ambiente y luz natural; los efectos son registrados a las 24, 48, 72 y 96 horas.

### **Bioensayo de fuga de electrolitos.**

Diez discos cortados, usando una perforadora para papel (aproximadamente 55 mg de peso fresco), de la primera o la segunda hoja de plántulas de cuatro meses aclimatadas en invernadero, se colocan en un vial conteniendo solución de filtrado crudo, medio sin inocular o agua desionizada. Con el fin de establecer las condiciones óptimas para realizar el bioensayo de fuga de electrolitos se evaluaron los siguientes métodos:

#### **Método 1**

Los discos se tratan con 1 ml de la solución a evaluar y se incuban por tres horas a temperatura ambiente con agitación ocasional. Transcurrido el tiempo de incubación, los discos se enjuagan por 10 minutos con cinco cambios de agua desionizada y se transfieren a un vial limpio conteniendo 5 ml de agua desionizada. La conductividad se determina con un conductímetro (Cole-Parmer modelo 4070), a los tiempos: 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9 y 24 horas.

#### **Método 2**

Los discos se tratan con 1 ml de la solución a evaluar y se infiltran al vacío durante 30 minutos; a continuación se incuban por 12, 18 y 24 horas en condiciones estáticas o de agitación (100 rpm). Terminado el tiempo de incubación, los discos son enjuagados por 10 minutos con cinco cambios de agua desionizada y se transfieren a un vial limpio conteniendo 5 ml de agua desionizada. La conductividad se determina con un conductímetro a los tiempos: 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9 y 24 horas.

### **Bioensayo de infiltración.**

La primera o la segunda hoja de plántulas de cuatro meses, aclimatadas en invernadero, se escinde y desinfectan durante un minuto con un desinfectante comercial (Cloralex) al 5 %. Las hojas se enjuagan, se secan y se colocan en un recipiente de plástico, previamente desinfectado con etanol al 70 %, conteniendo dos capas de papel húmedo. La infiltración se realiza con la ayuda de una jeringa para insulina, inyectando a la hoja, sobre la vena principal, 0.5 ml de cada uno de los siguientes tratamientos: filtrado crudo, medio sin inocular y agua destilada. Los recipientes son incubados bajo condiciones de temperatura ambiente y luz natural y los efectos son registrados a las 24, 48 y 72 horas.

## Resultados y discusión.

Para la optimización del bioensayo de gota se evaluaron los siguientes factores:

- a) Máxima difusión de muestra y mínimo daño mecánico a la hoja.
- b) La edad óptima de las hojas de plantas de banano que permitieran observar claramente las lesiones ocasionadas por el filtrado crudo.
- c) Cantidad mínima de muestra necesaria para observar actividad fitotóxica.
- d) La mejor cara de la hoja para depositar la gota.
- e) El tiempo mínimo requerido para observar actividad fitotóxica.
- f) El número de hoja más susceptible al efecto fitotóxico del filtrado crudo.

Los resultados obtenidos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- a) El método de incisión con bisturí permite una mejor difusión del filtrado crudo y por lo tanto, una fácil diferenciación entre el daño ocasionado por los metabolitos fitotóxicos y la fenolización causada por el daño mecánico.
- b) Las hojas de plantas de banano de cuatro meses, utilizadas en el método de incisión, son las adecuadas para observar claramente las lesiones fitotóxicas ocasionadas por el filtrado crudo, ya que las hojas de plántulas de hasta 8 semanas, utilizadas en el método de punción, no permiten observar actividad fitotóxica debido a la alta fenolización que presentan.
- c) Una gota de 20  $\mu$ l del filtrado crudo es la cantidad adecuada para mantener la integridad de la misma (no se escurre de la hoja).
- d) La cara adaxial de la hoja es la adecuada para observar mejor la presencia de actividad fitotóxica.
- e) El tiempo máximo para conservar la integridad de la hoja es de 96 horas y el tiempo óptimo para observar actividad fitotóxica es de 72 horas.
- f) No existen diferencias significativas en susceptibilidad entre la hoja 0 y la hoja número 4 (Fig. 1).

Para llevar a cabo la estandarización del bioensayo de fuga de electrolitos se utilizaron dos métodos y se planteó evaluar los siguientes factores:

- a) El tiempo mínimo necesario de incubación y lixiviación para observar conductividad como resultado de actividad fitotóxica.
- b) Las condiciones óptimas necesarias para diferenciar la conductividad propia del medio de cultivo y la conductividad observada como resultado de actividad fitotóxica.

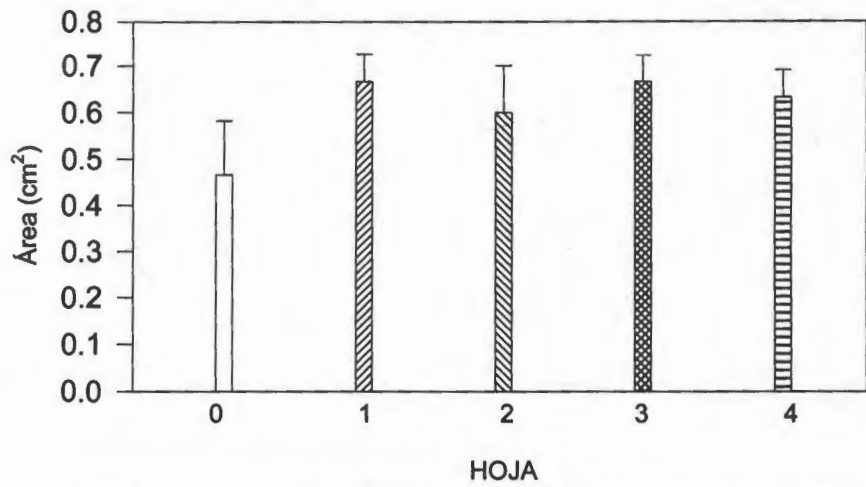


Figura1. Comparación del área de lesión en distintos números de las hojas. La barra representa la media de 3 muestras +/- desviación estándar.

- c) La concentración mínima de filtrado crudo requerida para observar cambios en la conductividad como resultado de la actividad fitotóxica.

Los resultados obtenidos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- a) Las condiciones utilizadas en el método sin infiltración al vacío no son las adecuadas, debido a que no se observaron diferencias en la conductividad obtenida del tratamiento de los discos de hoja con el filtrado crudo de aquellos tratados con los controles. Por otra parte, la condición utilizada en el método 2, infiltración al vacío por 30 minutos, permitió observar claras diferencias en conductividad entre los discos tratados con el filtrado crudo de aquellos tratados con los controles, después de incubarse durante 18 horas (Fig. 2). Aún cuando a partir de 30 minutos de lixiviación se observaron diferencias en la conductividad entre los discos tratados con el filtrado crudo, y los tratados con los controles, se estableció que el tiempo óptimo de lixiviación era de cinco horas, tiempo en el cual se registra el mayor cambio en la conductividad (Fig. 3).
- b) Las condiciones de incubación tanto en agitación como estáticas no mostraron diferencias significativas.
- c) La concentración óptima que permite diferenciar la conductividad propia del medio con la observada por el tratamiento con filtrado crudo como resultado de actividad fitotóxica es de 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Fig. 4).

Para la evaluación del bioensayo de infiltración se tomaron en cuenta los siguientes factores:

- a) Edad óptima de las hojas de las plantas de banano que permitiera diferenciar entre la fenolización natural y la actividad fitotóxica.
- b) Tiempo óptimo de incubación.

Los resultados obtenidos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- a) Las hojas de cuatro meses son las adecuadas para diferenciar la fenolización natural de la ocasionada por el filtrado crudo.
- b) El tiempo óptimo requerido para observar actividad fitotóxica es de 72 horas.



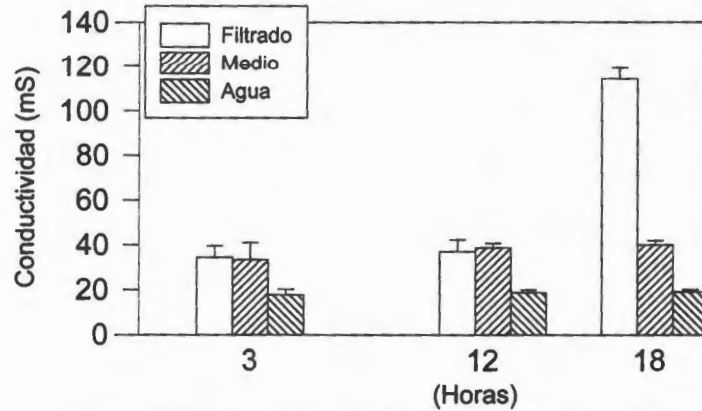


Figura. 2 Conductividad medida mediante el bioensayo de fuga de electrolitos después de cinco horas de lixiviación. La barra representa la media de 3 muestras +/- desviación estandar.

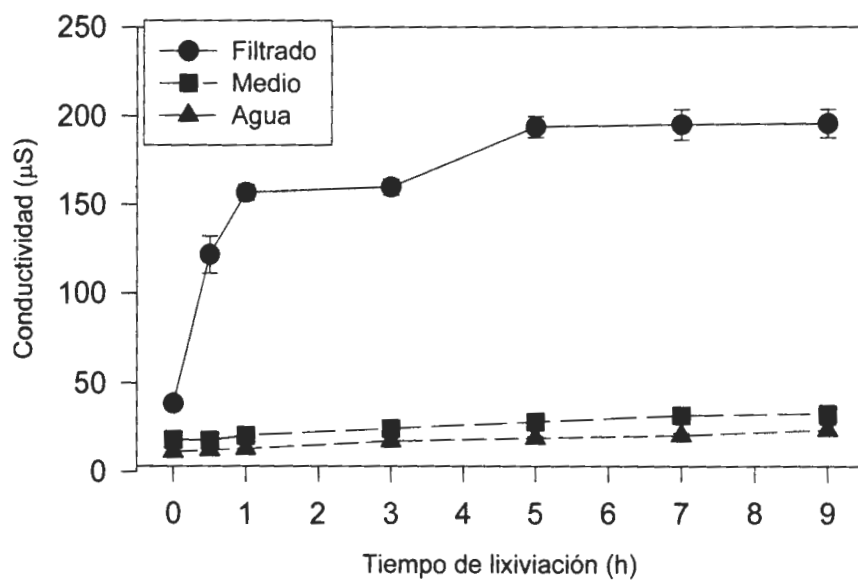


Figura 3. Conductividad medida después de 18 horas de incubación.

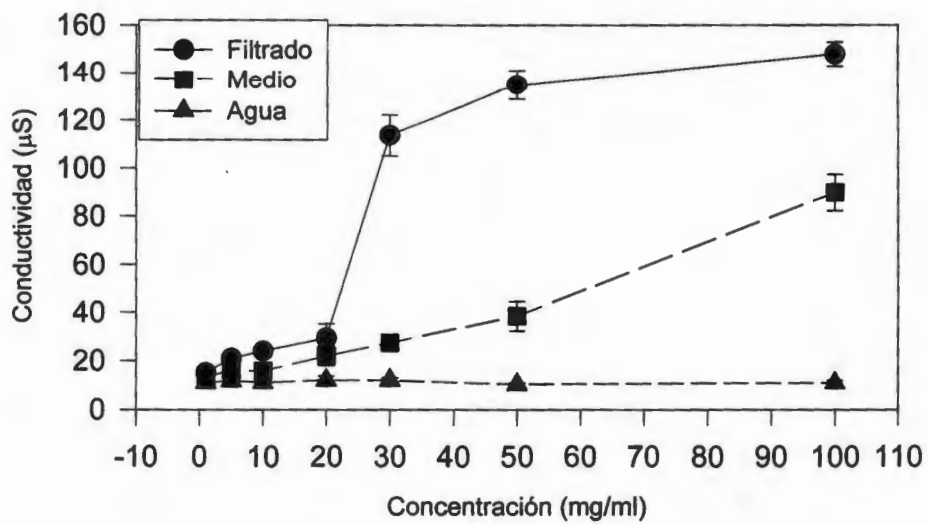


Figura 4 Conductividad a diferentes concentraciones de filtrado crudo medida después de 18 horas de incubación y 5 horas de lixiviación.



## Capítulo 6

### Evaluación de la actividad fitotóxica de los filtrados crudos correspondientes en los diferentes bioensayos.

#### Introducción

Los estudios encaminados a la elucidación estructural o de los mecanismos de acción de las fitotoxinas necesariamente requieren de un método de bioensayo que permita la detección de su actividad. En la literatura existen numerosos reportes de bioensayos utilizados para la detección de este tipo de actividad y los autores concuerdan con la idea de que un buen bioensayo es aquel que es simple, rápido, reproducible, cuantitativo y que requiere pequeñas cantidades de muestra. En el caso particular de *M. fijiensis*, la mayoría de los estudios han descrito el uso del bioensayo de gota para la detección de actividad fitotóxica (1,2); un sólo estudio ha utilizado el uso del bioensayo de fuga de electrolitos y ninguno, el uso del bioensayo de infiltración (3).

Con la finalidad de encontrar cuál de los tres bioensayos: de gota, de fuga de electrolitos ó infiltración, cumple con los requisitos mencionados con anterioridad se decidió evaluar la actividad fitotóxica del filtrado crudo del cultivo del hongo en medio de jugo V-8, incubado en agitación y fotoperiodo (12 horas de luz/12 horas de oscuridad) en los diferentes bioensayos.

#### Materiales y métodos

##### Preparación de filtrado.

Los filtrados liofilizados se evaluaron a una concentración de 30 mg/ml (Ver capítulo 5).

##### Preparación de los extractos orgánicos.

Cinco microlitros de una solución al 4% del extracto orgánico en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  se adsorben sobre una placa de gel de sílice ( $0.25 \text{ mm}^2$ ). Una vez evaporado el disolvente, la gel de sílice se remueve y se deposita sobre  $20 \mu\text{l}$  de agua destilada colocados sobre una incisión previamente realizada en la hoja. El control se inocula de la misma manera que los extractos orgánicos. Se realizan dos incisiones por tratamiento y dos hojas por experimento.

### **Material vegetal**

Plántulas de banano variedad enano gigante (susceptible), fougamou (tolerante), y yangambi km 5 (resistente), obtenidas del INIBAP fueron multiplicadas a través de cultivo de tejidos, utilizando meristemas, en medio MS suplementado con BAP (2 mg/l), repitiendo este proceso cada 15 días. Para la fase de enraizamiento, las plántulas de mayor tamaño fueron transferidas a cajas magenta conteniendo medio MS sin reguladores de crecimiento. Después de tres semanas, las plántulas fueron transferidas al invernadero en charolas de plástico para su aclimatación; cuatro semanas más tarde las plántulas fueron cambiadas a bolsas de plástico negro conteniendo una mezcla de abono-tierra (1:4).

### **Bioensayo de gota**

La segunda hoja de plántulas de cuatro meses, aclimatadas en invernadero, se escinden y se desinfectan durante un minuto con un desinfectante comercial (Cloralex) al 5 %. A continuación las hojas se enjuagan, se secan y se colocan en un recipiente de plástico, previamente desinfectado con etanol al 70 %, conteniendo en el fondo dos capas de papel filtro previamente humedecido con agua. Se realizan 6 incisiones (dos por cada tratamiento) con ayuda de una aguja de disección sobre la cara adaxial de la hoja, aplicándose 20  $\mu$ l de los siguientes tratamientos: filtrado crudo, medio sin ionocular y agua destilada estéril.

Se utilizan dos hojas para cada tratamiento y los recipientes son mantenidos bajo condiciones de temperatura y luz natural; los efectos son registrados a las 72 horas.

### **Fuga total de electrolitos.**

Para determinar la fuga total de los discos de hoja utilizados en el bioensayo de fuga de electrolitos, éstos se autoclavean durante 20 minutos a 120 ° C y 15 lb de presión. Se dejan enfriar y posteriormente se mide la conductividad. La fórmula para determinar el porcentaje de daño celular es la siguiente:

$$\% DC = (Cf / Ct) (100)$$

DONDE:

% DC= Por ciento de daño celular.

Ci = Conductividad inicial, obtenida de los discos tratados con el filtrado crudo.

Ct = Conductividad total, obtenida de los discos autoclaveados.

Cf = Ct - Ci

### Resultados y discusión.

Los resultados obtenidos mediante el bioensayo de gota, en las plántulas de banano con diferente sensibilidad a *M. fijiensis*, mostraron que no existe correlación en cuanto a la fitotoxicidad del filtrado crudo y lo observado en campo con el patógeno (Fig. 5), es decir, el área de lesión para la variedad tolerante (0.4742 cm<sup>2</sup>) fue similar a la observada en el caso de la variedad resistente (0.5428 cm<sup>2</sup>). Estos resultados no coinciden con los reportes existentes en la literatura donde la actividad, tanto del filtrado acuoso como del extracto orgánico, evaluada mediante el bioensayo de gota, se relaciona directamente con la resistencia o susceptibilidad observada para las diferentes variedades en el campo (1,2).

Por otra parte, el bioensayo de fuga de electrolitos mostró que aún cuando la conductividad aumenta como resultado de fitotoxicidad del filtrado crudo, no existen diferencias en cuanto a daño celular entre las diferentes variedades evaluadas (Fig. 6). Estos resultados confirman lo reportado en la literatura, donde al evaluar cultivares con diferente sensibilidad a *M. fijiensis*, se encontró que los efectos causados por el extracto orgánico crudo no coincide con los patrones de resistencia o susceptibilidad de las diferentes variedades en el campo (3).

De igual forma, al evaluar el filtrado crudo en el bioensayo de infiltración no se encontraron diferencias entre las variedades con diferente sensibilidad al patógeno. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el bioensayo de gota y el bioensayo de fuga de electrolitos.

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que el filtrado crudo de la cepa W VI de *M. fijiensis* utilizado para estas evaluaciones no contiene la o las fitotoxinas responsables de la especificidad. Lo anterior se confirmó al evaluar la fitotoxicidad del filtrado crudo en *Ravenalla madagascariensis* y *Heliconia latispata*, variedades no hospederas de *M. fijiensis* (Fig. 7).

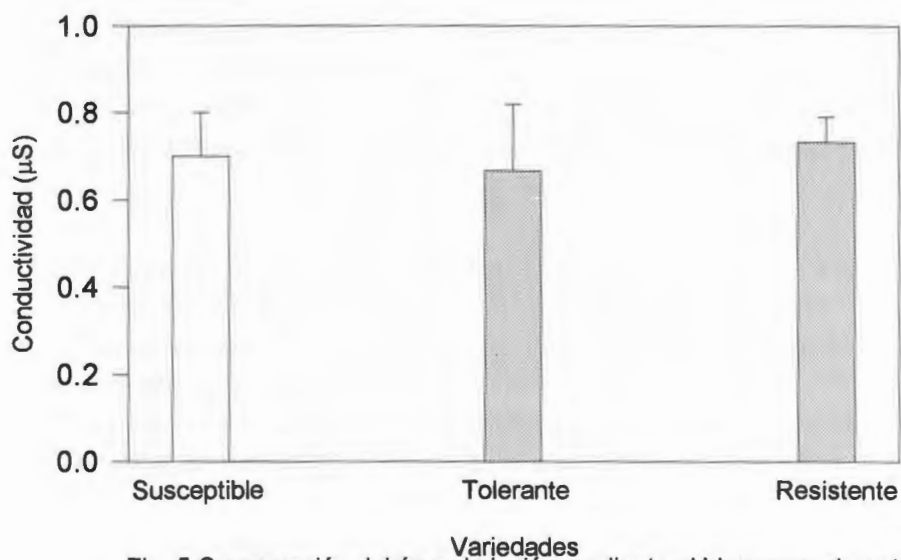


Fig. 5 Comparación del área de lesión mediante el bioensayo de gota en distintas variedades. La barra representa la media de 3 muestras +/- desviación estándar.



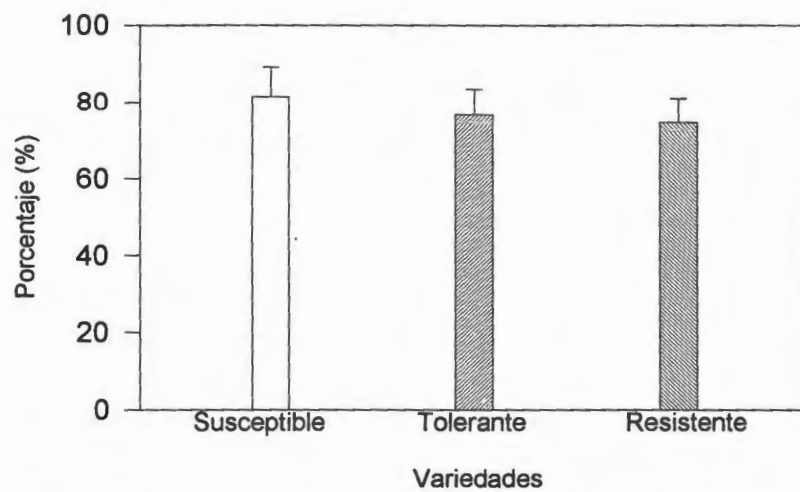


Figura 6. Comparación del porcentaje de daño celular en diferentes variedades de banano mediante el bioensayo de fuga de electrolitos. Las barras representan la media de 3 diferentes muestras +/- desviación estandar.

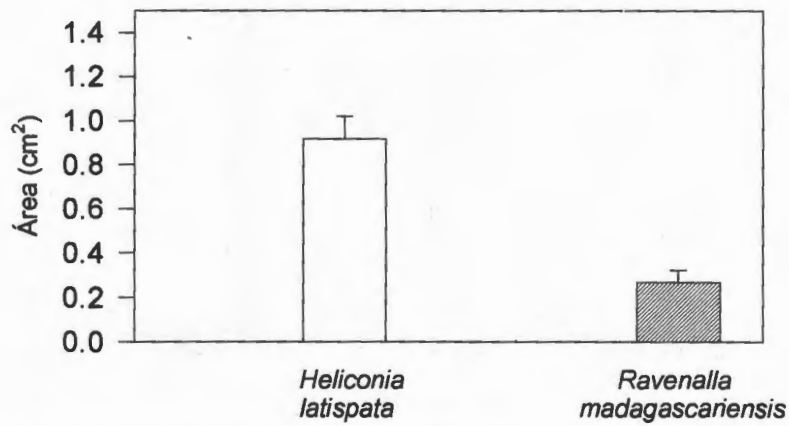


Figura 7. Actividad medida mediante el bioensayo de gota en especies no hospedadas de *M. fijiensis*. La barra representa la media de 3 muestras +/- desviación estandar.

Con el fin de observar si la separación de los componentes hidrofílicos y lipofílicos presentes en el filtrado crudo modificaba las respuestas obtenidas, se decidió evaluar la actividad fitotóxica del extracto orgánico y la fase acuosa residual correspondiente. Los resultados del bioensayo de gota no mostraron diferencias en actividad entre ambas fases (Fig. 8), indicando que *M. fijiensis*, en las condiciones evaluadas, produce metabolitos fitotóxicos, tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica. Cabe mencionar que los estudios realizados hasta ahora no reportan actividad en la fase acuosa, por lo que sería interesante el llevar a cabo estudios encaminados hacia el aislamiento e identificación de los metabolitos hidrofílicos y compararlos, en estructura y actividad, con los ya reportados en la literatura.

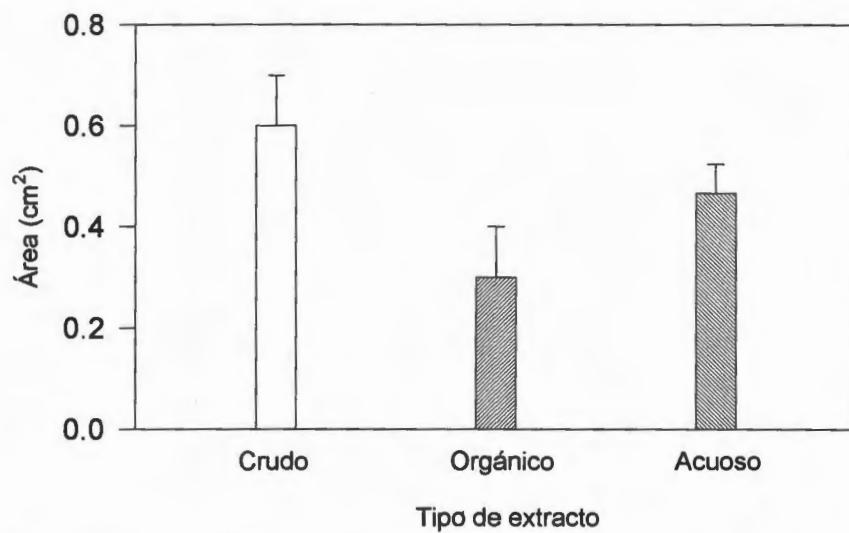


Figura 8. Comparación de actividad mediante el bioensayo de gota de diversas fases de extracción. La barra representa la media de 3 muestras +/- desviación estandar n=3

## Bibliografia

- 1.- **Molina, G. C. and Krausz, J. P.** (1988) "A phytotoxic activity in extracts of broth cultures of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and its use to evaluate host resistance to Black Sigatoka". *Plant Dis.* **73**, 142 - 143.
- 2.- **Stierle, A. A., Upadhyay, R., Hershenhorn, G. A., Strobel, G. A., and Molina, G.** (1991) "The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black sigatoka disease of bananas and plantains". *Experientia* **47**, 853 - 858.
- 3.- **Harelimana, G., Lepoivre, P., Jijakli, H., and Mourichon, X.** (1997) "Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black Leaf Streak". *Euphytica* **96**, 125 - 128.



## Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el medio de jugo V-8, en condiciones de agitación y fotoperiodo 12/12, es el adecuado para el crecimiento y la producción de metabolitos fitotóxicos de *M. fijiensis* Morelet. Es importante hacer notar que en la literatura se reporta el medio M1D como el adecuado para la producción de fitotoxinas de *M. fijiensis* Morelet; sin embargo, el presente trabajo, muestra una ausencia de actividad fitotóxica en los filtrados de este medio, aun cuando el rendimiento de los extractos orgánicos crudos obtenidos fueron similares a los reportados en la literatura.

Por otro lado, la evaluación de los diferentes medios de cultivo mostraron que la adición de infusión de hojas de banano inhibe el crecimiento de *M. fijiensis*; estos resultados no concuerdan con los reportes en la literatura donde se menciona que la adición de una infusión del hospedero al medio de cultivo favorece el crecimiento del patógeno e incrementa la producción de metabolitos fitotóxicos. Siendo éste el primer trabajo donde se reporta el uso de infusión de hoja de banano, los resultados obtenidos sugieren que la infusión de hojas de banano contiene fitoalexinas que inhiben el crecimiento de *M. fijiensis*, aún cuando en la literatura existen dos estudios que reportan el aislamiento y elucidación estructural de fitoalexinas de banano, en ninguno de los casos se llevó a cabo una evaluación de la actividad inhibitoria de las fitoalexinas obtenidas en el crecimiento de *M. fijiensis*; por lo anterior sería interesante el desarrollar un proyecto encaminado hacia la evaluación de la actividad de las fitoalexinas de banano en el crecimiento del patógeno, tanto *in vitro* como *in planta*, con el fin de explorar el posible desarrollo de un método de control biodegradable para la Sigatoka Negra.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que no existe una correlación entre la fitotoxicidad del filtrado crudo y la susceptibilidad observada con las plantas en campo con el patógeno. Lo anterior concuerda con un reporte reciente en la literatura donde, al evaluar cultivares con diferente sensibilidad a *M. fijiensis*, se encontró que los efectos causados por el extracto orgánico crudo no coincide con los patrones de resistencia o susceptibilidad de las diferentes variedades en el campo.

Es interesante hacer notar que el presente trabajo es el primero que reporta actividad en la fase acuosa de cultivos de *M. fijiensis*, por lo que sería también importante el desarrollar un proyecto encaminado hacia la identificación de los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica en la fase acuosa.

Por último es importante enfatizar, que las fitotoxinas de *M. fijiensis* representan una herramienta importante como agentes de selección *in vitro* de plantas resistentes. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican también que la falta de conocimiento acerca de los eventos básicos que suceden en la enfermedad y la falta de estudios encaminados para la elucidación estructural de los metabolitos producidos por el patógeno, constituyen dos factores limitantes para el desarrollo de proyectos encaminados a la búsqueda de especies de *Musa* resistentes a la Sigatoka Negra.



## Conclusiones y perspectivas

### Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- El medio V-8 incubado en condiciones de agitación y fotoperíodo 12/12, es el adecuado para el crecimiento y la producción de metabolitos fitotóxicos de *M. fijiensis* Morelet cepa WVI.
- La adición de infusión de banano a los medios inhibe el crecimiento del patógeno.
- Las hojas de plantas de banano de cuatro meses son las adecuadas para observar actividad fitotóxica.
- La concentración óptima necesaria de filtrado crudo para observar fitotoxicidad en el bioensayo de gota y de fuga de electrolitos es de 30 mg/ml.
- En el bioensayo de gota, la técnica de incisión con bisturí permite diferenciar la actividad fitotóxica de la fenolización ocasionada por el daño.
- Un volumen de 20  $\mu$ l es adecuado para mantener la integridad de la gota.
- En el bioensayo de gota, la cara adaxial de la hoja es la adecuada para observar lesiones fitotóxicas.
- El tiempo óptimo para observar actividad fitotóxica es de 72 horas en los bioensayos de gota e infiltración.
- El número de hoja no representa un factor determinante para la detección de fitotoxicidad.
- En el bioensayo de fuga de electrolitos, el tiempo mínimo de incubación para los discos de hoja de banano es de 18 horas y 30 minutos de infiltración.
- En el bioensayo de fuga de electrolitos, el tiempo óptimo de lixiviación es de 5 horas.
- Los resultados obtenidos en los tres bioensayos evaluados muestran que no existe una relación de los resultados *in vitro* con la resistencia y susceptibilidad de las plantas en campo.
- Bajo las condiciones evaluadas, el hongo *M. fijiensis* Morelet cepa WVI produce metabolitos fitotóxicos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, como pudo comprobarse por medio del bioensayo de gota.

## Perspectivas

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis "Evaluación de la actividad fitotóxica de *M. fijiensis* Morelet mediante el uso de diferentes técnicas de bioensayo" nos permiten plantear las siguientes perspectivas:

A corto plazo desarrollar un proyecto encaminado a la elucidación estructural de los metabolitos fitotóxicos responsables de la actividad en los medios de jugo V-8 en condiciones de agitación y fotoperíodo 12/12, con esto se descartaría la posible diferencia en la producción de fitotoxinas con respecto al medio M1D, que es el reportado en la literatura como el adecuado para la producción de las mismas.

Al mismo tiempo podría llevarse a cabo un estudio de estructura actividad, el cual estaría enfocado a descubrir cual o cuales son los metabolitos responsables de la infección y determinar si se producen toxinas específicas de huésped (HST) o de lo contrario no específicas de huésped ( no-HST).

A mediano plazo, una vez desarrollados los proyectos anteriores sería conveniente aislar los metabolitos fitotóxicos producidos "*in planta*" y compararlos con aquellos obtenidos "*in vitro*" mediante el uso de diferentes técnicas de bioensayo y observar si las respuestas de sensibilidad al huésped son las mismas que las observadas en campo.

Por otra parte, sería interesante el desarrollo de un estudio acerca de las fitoalexinas producidas en la infusión de banano, las cuales impidieron el crecimiento de *M. fijiensis* Morelet en todas las condiciones evaluadas donde se le adicionó dicha infusión, de manera paralela se podrían evaluar las fitoalexinas parcialmente purificadas y purificadas en estudios de inhibición "*in vitro*", las cuales nos guiarían para el posible desarrollo de un método de control biodegradable de la Sigatoka Negra.

## Apendice I

### Preparación de medios líquidos definidos

#### Medio M1D

Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	283.00 mg/l
KNO <sub>3</sub>	79.00 mg/l
KCl	65.00 mg/l
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	736.00 mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	908.00 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	4990.00 mg/l
FeCl <sub>3</sub> .6 H <sub>2</sub> O	3.00 mg/l
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5.00 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	2.50 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.36 mg/l
KI	750.00 mg/l
SACAROSA	30.00 g/l
pH	5.5

#### Extracto de levadura CZAPEK

Na NO <sub>3</sub>	3.00 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00 g/l
Mg SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.50 g/l
Fe SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.01 g/l
KCl	0.50 g/l
EXTRACTO DE LEVADURA	1.00 g/l
SACAROSA	30.00 g/l
pH	5.5

### Medio nutritivo sintético (MNS)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.00 g/l
$\text{KNO}_3$	1.00 g/l
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.50 g/l
KCl	0.50 g/l
SACAROSA	20.00 g/l
pH	5.5

## Apéndice II

### Preparación de medios líquidos indefinidos

#### Medio de jugo V-8

Jugo V-8 (Herdez)	200 ml/l
Ca CO <sub>3</sub>	2 g/l
AGUA DESTILADA c.b.p.	1000 ml
pH	5.5

#### Caldo de papa dextrosa (PDB)

PAPAS PELADAS Y PICADAS	500 g
DEXTROSA	20 g
AGUA DESTILADA c.b.p.	1 000 ml

Las papas se pelan y se pican lo más finamente posible. Cuando el agua (800 ml) esté hirviendo se agregan las papas y se dejan hervir 30 minutos. Se enfría, se filtra a través de gasa, se adiciona la dextrosa y se afora a 1000 ml; el pH se ajusta a 5.5. El medio se autoclavea a 120 ° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

### **Medio de infusión de banano y azúcar**

HOJAS DE BANANO	200 g/l
SACAROSA	20 g/l
AGUA DESTILADA c.b.p.	1000 ml
pH	5.5

Se ponen a hervir 800 ml de agua destilada, cuando comienza a hervir se pican las hojas y se depositan en el agua dejandolas hervir durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se deja enfriar, se filtra, se le adiciona el azúcar y se afora a 1000 ml con agua destilada, ajustando el pH a 5.5. El medio es autoclaveado a 120 ° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

### **Infusión de banano y azúcar**

HOJAS DE BANANO	40 g/l
SACAROSA	20 g/l
AGUA DESTILADA c.b.p	1000 ml
pH	5.5

Se ponen a hervir 800 ml de agua destilada, cuando comienza a hervir se pican las hojas y se depositan en el agua dejandolas hervir 30 minutos. Transcurrido el tiempo se deja enfriar, se filtra, se le adiciona el azúcar y se afora a 1000 ml con agua destilada, ajustando el pH a 5.5. El medio es autoclaveado a 120 ° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Para la preparación de los medios con infusión la relación es 1:1 de medio e infusión.

## Apéndice III

### Estadística

Fig. 1 Comparación del área de lesión en distintos números de las hojas.

	HOJA 0	HOJA 1	HOJA 2	HOJA 3	HOJA 4
DATO 1	0.6	0.7	0.6	0.7	0.6
DATO 2	0.4	0.6	0.5	0.7	0.5
DATO 3	0.4	0.7	0.7	0.6	0.6
MEDIA	0.4667	0.6667	0.6000	0.6667	0.6334
DESVEST	0.1154	0.0577	0.1000	0.0577	0.0577

Fig. 2 Conductividad medida mediante el bioensayo de fuga de electrolitos después de cinco horas de lixiviación.

	3			12			18		
	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA
DATO 1	40	40	15	43	38	18	110	40	18
DATO 2	30	25	20	33	41	20	115	38	20
DATO 3	33	35	19	35	37	18	120	42	19
MEDIA	34.3333	33.3333	17.6667	37.0000	38.6667	18.6667	115.0000	40.0000	19.0000
DESVEST	5.1316	7.6376	2.5166	5.2915	2.0816	1.1547	5.0000	2.0000	1.0000

Fig. 3 Conductividad medida después de 18 horas de incubación.

	0			0.5			1			3		
	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA
DATO 1	37	15	10	125	22	12	150	25	12	155	25	15
DATO 2	40	20	9	110	17	10	163	19	11	164	22	18
DATO 3	38	19	15	130	16	15	157	17	16	160	26	19

MEDIA	38.3333	18.0000	11.3333	121.6667	17.6667	12.3333	156.6667	20.3333	13.0000	159.6667	24.3333	17.3333
DESVEST	1.5275	2.6457	3.2145	10.4083	3.2145	2.5166	6.5064	4.1633	2.6457	4.5092	2.0816	2.0816

Continuación Fig. 3

### TIEMPO DE LIXIVIACION (h)

	5			7			9		
	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA
DATO 1	200	28	18	205	30	20	204	30	26
DATO 2	188	30	20	190	32	22	195	33	25
DATO 3	193	26	19	190	33	20	188	35	20
MEDIA	193.6667	28.0000	19.0000	195.0000	31.6667	20.6667	195.6667	32.6667	23.6667
DESVEST	6.0277	2.0000	1.0000	8.6602	1.5275	1.1547	8.0208	2.5166	3.2145

Fig. 4 Conductividad a diferentes concentraciones de filtrado crudo medida después de 18 horas de incubación y 5 horas de lixiviación.

### CONCENTRACION (mg/ml)

	1			5			10		
	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA
DATO 1	15	15	10	22	15	11	23	16	11
DATO 2	17	13	12	20	16	12	25	15	10
DATO 3	13	12	11	21	17	12	24	16	12
MEDIA	15.0000	13.3333	11.0000	21.0000	16.0000	11.6667	24.0000	15.6667	11.0000
DESVEST	2.0000	1.5275	1.0000	1.0000	1.0000	0.5773	1.0000	0.5773	1.0000

Continuación Fig. 4

	20			30			50			100		
	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA	FILTRADO	MEDIO	AGUA
27	18	11	112	30	12	137	45	10	153	98	12	
25	22	11	106	25	11	140	37	11	143	88	11	
36	26	14	123	27	13	128	33	10	148	83	10	



29.3333	22.0000	12.0000	113.6667	27.3333	12.0000	135.0000	38.3333	10.3333	148.0000	89.6667	11.0000
5.8594	4.0000	1.7320	8.6216	2.5166	1.0000	6.2449	6.1101	0.5773	5.0000	7.6376	1.0000

Fig. 5 Comparación del área de lesión mediante el bioensayo de gota en distintas variedades.

	SUSCEPTIBLE	TOLERANTE	RESISTENTE
DATO 1	0.8	0.5	0.8
DATO 2	0.6	0.7	0.7
DATO 3	0.7	0.8	0.7
MEDIA	0.7000	0.6667	0.7333
DESVEST	0.1000	0.1527	0.0577

Fig. 6 Comparación del porcentaje de daño celular en diferentes variedades de banano mediante el bioensayo de fuga de electrolitos.

	SUSCEPTIBLE	TOLERANTE	RESISTENTE
DATO 1	90	70	68
DATO 2	75	78	77
DATO 3	80	83	80
MEDIA	81.6667	77.0000	75.0000
DESVEST	7.6376	6.5574	6.2449

Fig. 7 Actividad medida mediante el bioensayo de gota en especies no hospederas de *M. fijiensis*.

	<i>Heliconia latispata</i>	<i>Ravenala madagascariensis</i>
DATO 1	1.00	0.3
DATO 2	0.95	0.2
DATO 3	0.80	0.3
MEDIA	0.9167	0.2667
DESVEST	0.1040	0.0577

Fig. 8 Comparación de actividad mediante el bioensayo de gota de diversas fases de extracción.

	FILTRADO CRUDO	EXT. ORGANICO	FASE ACUOSA
DATO 1	0.6	0.4	0.4
DATO 2	0.5	0.3	0.5

DATO 3	0.7	0.2	0.5
MEDIA	0.6000	0.3000	0.4667
DESVEST	0.1000	0.1000	0.0577