

## **TITULO:**

**EXPRESION DE LOS METABOLITOS TOXICOS DE *Mycosphaerella Fijiensis*.**

## **AUTORES:**

Juan José Aycart M<sup>1</sup>, Rodolfo Maribona Hernandez<sup>2</sup>

1 Tecnólogo Agrícola, 1997, Ingeniero Agropecuario 2003

2 Director de Tesis, Biólogo Bioquímico, Universidad de Lomonósov, 1971, M.Sc., Ph.D. Universidad de Lomonósov, 1979, Profesor de Espol desde 1997.

## **RESUMEN**

La enfermedad foliar más importante en el cultivo del banano es la Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Considerando las variaciones edafo-climáticas existentes en las diferentes zonas bananeras del Ecuador existe la hipótesis de la existencia de diferentes biotipos del hongo. La expresión de virulencia, puede relacionarse con variaciones en la dinámica del crecimiento y la actividad biológica frente a diferentes genotipos de Musa, con distintos grados de resistencia al patógeno. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la dinámica de crecimiento y actividad biológica de tres aislamientos provenientes de zonas bananeras con diferentes condiciones edafoclimáticas y las posibles variaciones de patogenicidad sobre genotipos de Musa con diferentes grados de resistencia al hongo. Las variables estudiadas fueron: índice de peso seco a las 48 horas del micelio, conductimetría del extracto crudo toxico. Las curvas de crecimiento del patógeno mostraron diferencias en su dinámica de crecimiento pero la actividad de al extracto crudo no mostró actividad diferenciada para los diferentes genotipos estudiados.

## **INTRODUCCION**

El cultivo de banano alcanza altas producciones en una diversidad de climas, a los que se ve sometido, en la explotación agrícola. Pero es susceptible a un amplio rango de enfermedades foliares, la más severa de estas es la Sigatoka Negra<sup>1</sup>. Debido a que los controles químicos para esta enfermedad se han tornado demasiado costosos y afectan al medio ambiente<sup>2</sup>, el interés de algunos resultados prometedores ha sido enfocado en el campo del mejoramiento genético.

Ecuador al igual que otros países, se ha visto afectado por la presencia de la enfermedad<sup>3</sup>. Por lo que la investigación de los diferentes aspectos involucrados en el establecimiento de la relación patógeno-hospedero se hacen necesarios para contar con metodologías que ayuden en la búsqueda de

genotipos tolerantes o resistentes a la enfermedad<sup>4</sup>. El centro de investigaciones Biotecnológicas del Ecuador en la ESPOL esta trabajando en el área de Protección de plantas en la investigación y establecimiento de un banco de poblaciones del patógeno, ensayos al nivel de laboratorio, invernadero y campo de un grupo de accesiones con diferente expresión, que ayuden a entender las relaciones establecidas en el desarrollo de la enfermedad. Este estudio preliminar buscó establecer relaciones en el crecimiento del patógeno<sup>5</sup> y la producción de metabolitos tóxicos<sup>6</sup>, que pueda ser aplicado al cribaje de genotipos de banano en búsqueda de expresiones rápidas y sencillas al hongo causante de esta enfermedad: *M. fijiensis*.

## **CONTENIDO**

### **Materiales y Métodos**

#### **Evaluación de los Extractos Crudos Tóxicos (ECT).**

El ensayo fue realizado en el Centro de Biotecnología de la Espol (CIBE), en el área de fitopatología. A partir de una colección de cultivos monospóricos del patógeno se seleccionaron tres poblaciones de *M. fijiensis* provenientes de las provincias de Guayas, El Oro y Los Ríos. Estas fueron cultivadas en medios líquidos en agitación utilizando medio de cultivo V8. Del sobrenadante del cultivo líquido de tres aislados monospóricos se evaluó la actividad biológica del extracto tóxico. Se tomaron muestras de sobrenadante en los diferentes tiempos de crecimiento estudiados (3, 5, 10, 15, 20, 25,30 días de desarrollo), las muestras se concentran en un baño de María durante una hora. Para enfrentarlo con discos foliares de banano. El material vegetal estudiado pertenecía al banco de germoplasma del laboratorio de biotecnología de la ESPOL. Ubicado en el Campus Prosperina, en el sitio denominado como la cañada de las musas. Se tomó tejido foliar de plantas de banano de la parte central de la hoja, en el tercio central entre el borde y el pecíolo. La muestra se mantuvo húmeda y en una hielera de espumaflón para evitar que la fenolización del tejido. En el laboratorio las muestras foliares de banano fueron lavadas y se tomaron 10 discos de de 0.5 cm. de diámetro, en frascos de vidrio sumergiéndolos en agua bidestilada.

#### **Medición de conductimetría.**

Los extractos crudos tóxicos se incubaron con 10 discos foliares, tomando tres replicas por cada tratamiento y por cada material evaluado. Todos se incubaron juntos en una zaranda orbital a 140 r.p.m. por 24 horas, a 28 °C; aislado de la luz, en una cámara oscura. Se evaluó la liberación de electrolitos con un conductímetro, para pasar a poner las repeticiones en un autoclave a 121 °C

para poder medir la conductividad total. Calculando finalmente la integridad de la membrana celular.

## **Análisis De Datos**

Los datos obtenidos en el experimento fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS y se procedió hacer un análisis cluster para determinar las distancias entre los resultados de mortalidad celular de los discos foliares al ser expuestos al extracto crudo tóxico. Se realizó un gráfico de manhattan city block para determinar las distancias entre los diferentes tiempos que fue obtenido el extracto crudo tóxico. Con los datos de crecimiento de micelio se elaboro una curva de la dinámica del crecimiento en el tiempo para cada aislamiento estudiado.

## **Resultados y Discusión**

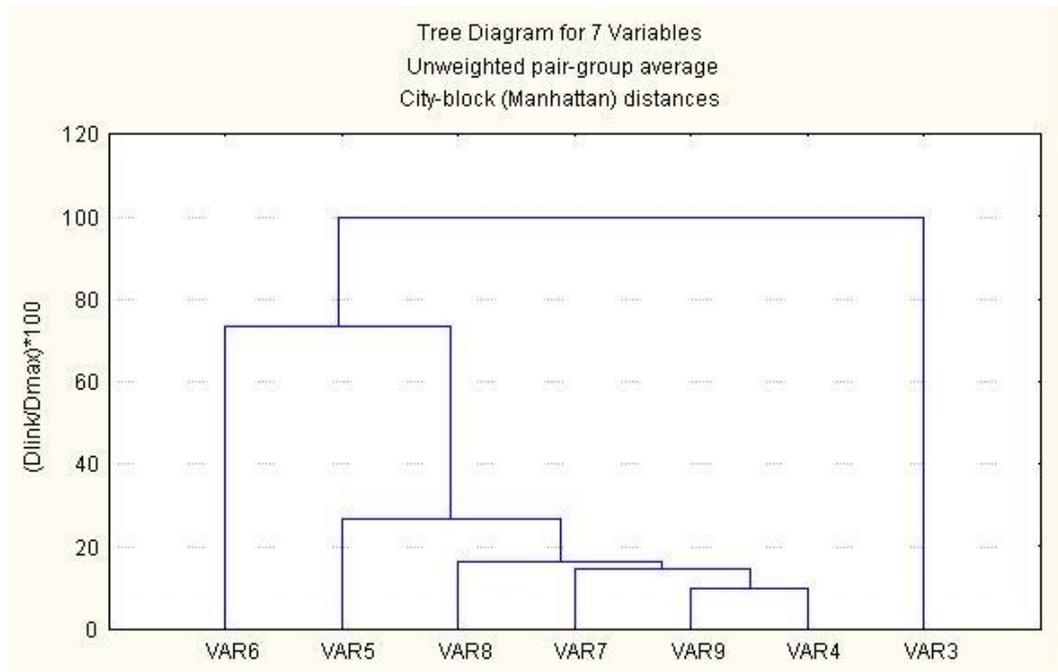
Los cultivos monospóricos demostraron ser la forma más segura de estudiar *M. fijiensis*, ya que su proceso de aislamiento asegura la eliminación de otros contaminantes y facilita el almacenamiento de los diferentes aislados en un área pequeña. Además permitió ensayar al mismo tiempo con más de una población de patógeno. La curva de crecimiento es una herramienta que ayuda a la caracterización de diferentes aislados patogénicos y provee fácilmente material necesario para el estudio del micelio y las toxinas. Estas mostraron diferencias (Fig. 4) entre los tres aislados ensayados que provenían de zonas edafoclimaticas distintas (Fig. 2 y 3).

La medición de la mortalidad celular mediante la conductimetría en discos foliares de banano es un método fácil y masivo para el estudios de los metabolitos tóxicos en *Mycosphaerella fijiensis*, trabajos anteriores usaron esta técnica con gran éxito (Stierle, A.A. 1991). El punto de máximo desarrollo y daño a los discos foliares fue a los 15 y 20 días. Esta observación sé presentó en los tres aislados estudiados y se concluye que es parte de la conducta y dinámica de crecimiento de *M fijiensis*. La actividad biológica del extracto crudo toxico fue mayor en estos días lo que concuerda con los resultados obtenidos por anteriores ensayos (Johanson, 2000) Estadísticamente se observa diferencias significativas en los tiempos estudiados tal como observo Harelmania *et al* 1997, quien concluyo que las toxinas puras de Sigatoka son determinantes secundarios de la patógenie por su actividad en la expansión de la lesión.

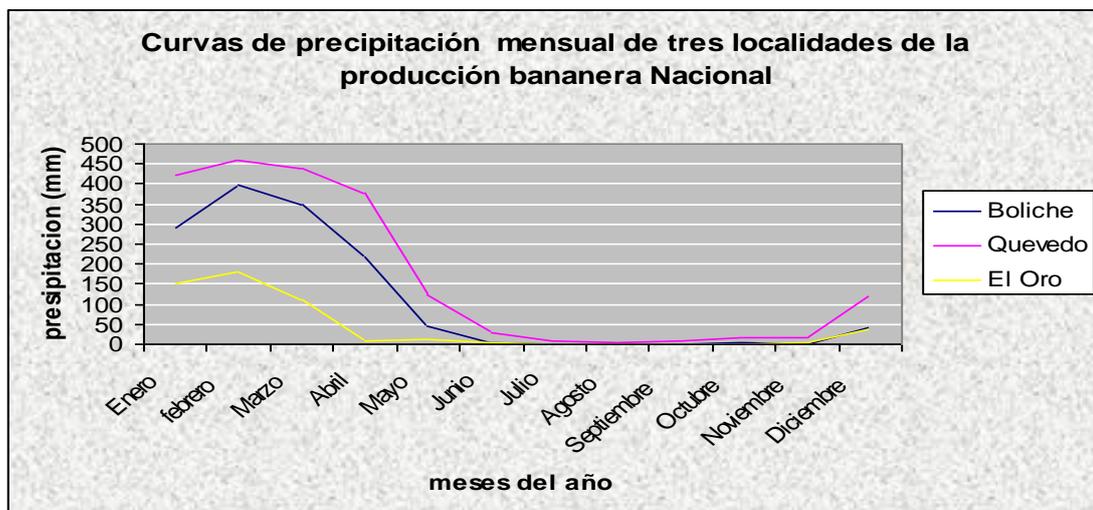
El dendograma (Fig. 1) demuestra como la mortalidad obtenida con el extracto crudo toxico en el tiempo 15 días de crecimiento de micelio posee una mortalidad celular que la diferencia de los demás tiempos de crecimiento como son tres (var. 3), cinco (var. 4), diez (var. 5), quince (var. 6), veinte (var. 7), veinte y cinco (var. 8), treinta (var. 9), días de crecimiento. El extracto que

mayor mortalidad celular se obtuvo en el máximo de desarrollo en la curva de crecimiento, lo cual corresponde al tiempo quince días (Fig. 4).

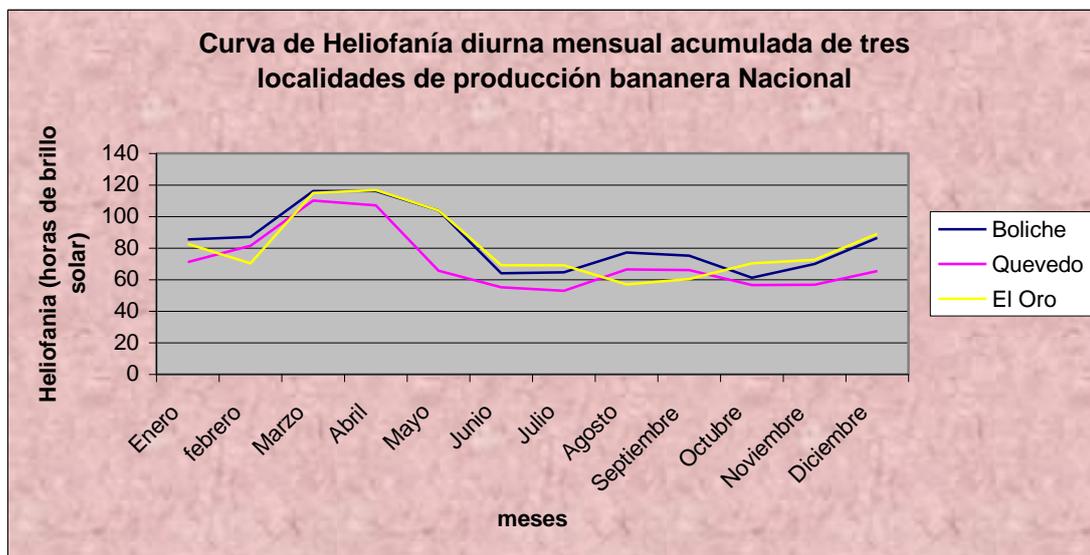
**Fig. 1 Dendograma de las diferentes variables de tiempo estudiadas. La variable 6 corresponde al tiempo 15 días.**



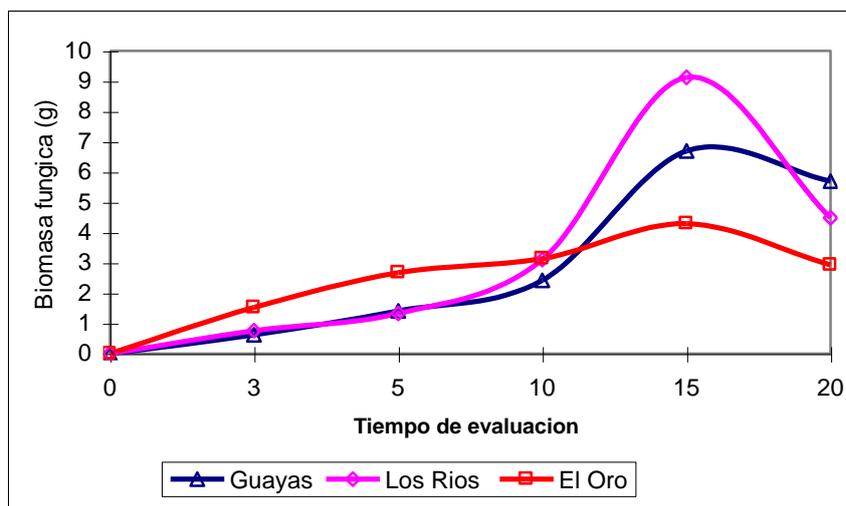
**Fig. 2 Curva de la precipitación mensual para las tres localidades estudiadas.**



**Fig. 3** Curva de la Heliofania mensual para las tres localidades estudiadas.



**Fig. 3** Curvas de crecimiento de tres aislamientos monospóricos obtenidos por cultivo liquido de *Mycosphaerella fijiensis*.



## CONCLUSIONES

El screenen usando el extracto crudo tóxico obtenido del cultivo in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*, demuestra ser un método válido y que ocupa poco espacio y tiempo. Este puede ser aplicado a gran escala en estadios jóvenes de las plantas producidas en un programa de mejoramiento genético. El factor de selección sería en este caso, en respuesta al extracto obtenido debido a lo importante de obtener información del comportamiento de las plantas y compararlo con el comportamiento en campo, o la respuesta por inoculación dirigida.

Al incubar la toxina y medir diferentes parámetros como la conductimetría, para encontrar el índice mortalidad celular, se obtuvieron parámetros que pueden utilizarse para identificar el tipo de respuesta de materiales germoplásmicos frente al extracto crudo de determinados aislados. Al caracterizar a los materiales frente a un rango amplio de aislados del patógeno se asegura que la planta mejorada está en capacidad de mantener sus características de resistencia frente a una población nacional de patógeno.

El crecimiento del micelio y la actividad biológica del extracto crudo poseen un punto de máximo desarrollo y daño a los discos foliares. El extracto de los 15 y 20 días manifestó una actividad biológica más significativa, relacionándose con la fase de mayor desarrollo del micelio después de la etapa lineal de crecimiento. Esta observación se presentó en los tres aislados estudiados y se concluye que es parte de la conducta y dinámica de crecimiento de *M fijiensis*. El extracto crudo toxico no diferencio entre genotipos resistentes y susceptibles por lo que se debe avanzar en el estudio de la patógenia con extractos mas puros de toxina.

## REFERENCIAS

1. Jones, D.R. 1999. **Diseases of Banana, Abacá, and Enset**. CABI publishing, CAB international
2. Chang, J.F 2000. Efectos de la Dolarización en el costo de Producción del Banano en el Ecuador. Acorbat 2000
3. Espinoza, Alfonso. 1998. Estudios epidemiológicos de la Sigatoka negra en Ecuador. Acorbat 98
4. García, L. 1996. Metodología para la selección de plantas in vitro para la resistencia a Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, en banano. Infomusa , Vol 6, No 1, Pag 14 – 15.
5. Harlenmania, G. 1997. Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to black leaf streak. Euphytica 96: 125-128.

6. Strobel, G.A .1992. The Phytotoxins of **Mycosphaerella fijiensis**, the causative agent of Black Sigatoka Disease, and their potential use in the Screening for disease resistance. Biotechnology application for Banana and Plantain Improvement. INIBAP