ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE Fusarium subglutinans Y SU EFECTO EN CALLOS DE PIÑA

R. Tapia, R. Santos, Magalis Quincose, L. M. Peña, O. Borrás, Bárbara Companioni, María A. Blanco y J. L. González

ABSTRACT. This experiment investigated the phytotoxic compound excretion from *Fusarium subglutinans*, the causal agent of Fusariose in pineapple. HPLC and UV absorption analyses revealed the higher levels of metabolites in 21 day-old cultures. Low concentrations of this compound inhibited callus growth of Smooth cayenne cultivar, while higher concentrations were needed to detect phytotoxic effect on resistant cultivar Perolera. Such trend can be used as selection criteria in future plant breeding programs.

Key words: *Fusarium*, callus culture, HPLC, toxins

RESUMEN. Se investigó la producción y liberación al medio de compuestos fitotóxicos durante el cultivo en medio líquido de *Fusarium subglutinans*, el agente causal de la fusariosis en la piña. El hongo libera los máximos niveles de metabolitos, comprobado por espectroscopía UV y HPLC, a los 21 días de sembrado en el medio de cultivo líquido. A bajas concentraciones del filtrado se inhibe el crecimiento de callos del cultivar Cayena lisa, mientras que se requirieron concentraciones superiores para apreciar este efecto inhibitorio en el cultivar resistente (Perolera). Este comportamiento puede ser empleado como criterio de selección en posteriores programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: *Fusarium*, cultivo de callos, HPLC, toxinas

1044

INTRODUCCIÓN

La fusariosis, causada por *Fusarium subglutinans*, constituye la enfermedad fungosa más importante (Pires de Matos, Mourichon y Lapeyre, 1991; Pires de Matos, Mourichon y Pinon, 1992) en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) para los principales productores.

Varias especies del género Fusarium son capaces de producir una amplia gama de metabolitos secundarios (Hashmi y Thrane, 1990; Thrane y Hansen, 1995; Moretti *et al.*, 1995), algunos de los cuales constituyen potentes toxinas en diversos vegetales (Sutherland y Pegg, 1995; Jin *et al.*, 1996a), siendo el ácido fusárico la más generalizada entre las diferentes especies.

El hecho de que células y protoplastos de plantas puedan ser seleccionados para la resistencia a una toxina del patógeno y que las plantas con una respuesta alterada a la infección por el microorganismo puedan ser regeneradas a partir de estas células cultivadas (Daub, 1986; Jin *et al.*, 1996b) constituye una ventaja en los programas de mejoramiento genético, ya que permite la selección de grandes poblaciones de plantas en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, pocos estudios se han conducido para determinar la influencia de estas toxinas en células y tejidos de piña.

El objetivo de este trabajo fue comprobar la influencia de los filtrados crudos de cultivos, obtenidos a partir del crecimiento de *Fusarium subglutinans* en medio líquido sobre callos de piña, con vistas a establecer un sistema de selección precoz para la resistencia a esta enfermedad a nivel de cultivo de tejidos, que permita la rápida liberación de nuevos cultivares resistentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo. En los experimentos se utilizó una cepa de *Fusarium subglutinans* presente en nuestras plantaciones piñeras. Tres discos de 1 cm de diámetro a partir del microorganismo crecido en papa dextrosa agar se inocularon en Erlenmeyers de 1 L, que contenían 300 mL de medio Caldo Czapek. El pH se ajustó a 5.3 y la temperatura a 25±0.2°C, con un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

Producción de metabolitos. A intervalos de tres días se evaluó la producción de metabolitos por el patógeno en el medio líquido, basado en análisis espectroscópico y cambios en el pH, correlacionado con el crecimiento del microorganismo.

Análisis de ácido fusárico en filtrados de cultivos. Los filtrados de cultivo correspondientes al momento de mayor absorbancia en el espectro UV-vis (Pharmacia LKB) se analizaron para determinar la presencia de ácido fusárico usando HPLC (Pharmacia LKB) en una columna RP-18 (5μm, 250 x 4 mm), según el procedi-

R. Tapia, R. Santos y O. Borrás, Investigadores; Bárbara Companioni, Reserva Científica; María A. Blanco y Dr. J. L. González, Investigadores Titulares del Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Avila, carretera a Morón km 9, Ciego de Avila CP 69450; Dra. Magalis Quincose, Profesora de la Facultad de Química, UCLV, carretera a Camajuaní km 5 Santa Clara y Dr. L. M. Peña, Investigador Titular del departamento de Química Orgánica, CICY AP924, Mérida, Yucatán, México.

Abreviaturas: BAP (6-Bencil aminopurina), Dicamba (ácido 3,6-Dicloro-o-anRsico)

miento empleado por Löffler y Mouris (1992) con pequeñas modificaciones. Una alícuota de 20 μL de filtrado de cultivo o ácido fusárico patrón 1 mM (Sigma) se eluyeron con MeOH- 2 % H_3PO_4 (7:3 v/v) durante 10 minutos a un flujo de 0.7 $mL.min^{-1}$. La absorbancia de los eluatos se midió con un detector UV a 270 nm.

Desarrollo de un bioensayo. Se tomaron callos de aproximadamente 10 mg de las variedades *Cayena lisa* (susceptible) y *Perolera* (resistente) y se colocaron sobre placas de Petri de 6 cm de diámetro, con 5 mL de medio MS suplementado con Dicamba (2.5 $mg.L^{-1}$) + BAP (0.5 $mg.L^{-1}$) y diferentes concentraciones del filtrado de cultivo (0, 10, 20 y 30 %) (v/v). Transcurridos siete días se determinó el rango de crecimiento de los callos sometidos a los diferentes tratamientos, según la fórmula empleada por Arai y Takeuchi (1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro UV de filtrados crudos de cultivo (Figura 1) muestra los perfiles del medio sin inocular e inoculado, así como la absorbancia a 270 nm y el pH del medio respectivamente.

En la Figura 1A se hace evidente la ausencia de compuestos que absorban en la región ultravioleta, mientras que en la Figura 1B, se puede apreciar una fuerte absorción en la zona cercana a los 270 nm, que nos indica la presencia de grupos orgánicos con insaturaciones conjugadas.

Por otra parte, en la Figura 1C se aprecia que a medida que transcurre el tiempo comienza a aumentar la absorción (12 días), debido a la producción de metabolitos en el medio, donde se alcanza un máximo de absorción a los 21 días, a partir del cual la señal detectada comienza a debilitarse.

Al analizar los cambios ocurridos en el pH del medio, se aprecia una ligera disminución en los primeros 12 días, a partir del cual se presenta una tendencia similar a la descrita anteriormente, con un cambio paulatino hacia la alcalinidad (pH 8.2), que coincide con el máximo de absorción.

La producción de toxinas ocurre en diferentes fases de la curva de crecimiento del patógeno; sin embargo, esta se encuentra estrechamente relacionada a una fase particular (Durbin, 1983). Al establecer la relación entre la producción del metabolito (Figura 1) y el crecimiento *in vitro* del microorganismo (Figura 2), se puede apreciar que los máximos niveles de síntesis son detectados en la fase exponencial en las condiciones descritas.

Numerosos trabajos demuestran la producción de varias toxinas por especies del género Fusarium (Blain *et al.*, 1991; Marasas *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 1995), entre las cuales se encuentra el ácido fusárico, un compuesto fitotóxico con máxima absorbancia alrededor de los 270 nm en el espectro UV, aunque no ha sido establecido su papel fundamental en la patogénesis (Binarová *et al.*, 1990).

El análisis por HPLC del filtrado crudo de cultivo correspondiente al momento de máxima absorbancia, demostró la presencia de tres picos, uno de los cuales corresponde con el t_R 5.25 ± 0.11 del ácido fusárico patrón (Figuras 3A y C), mientras que está ausente en el medio de cultivo no inoculado (Figura 3B).

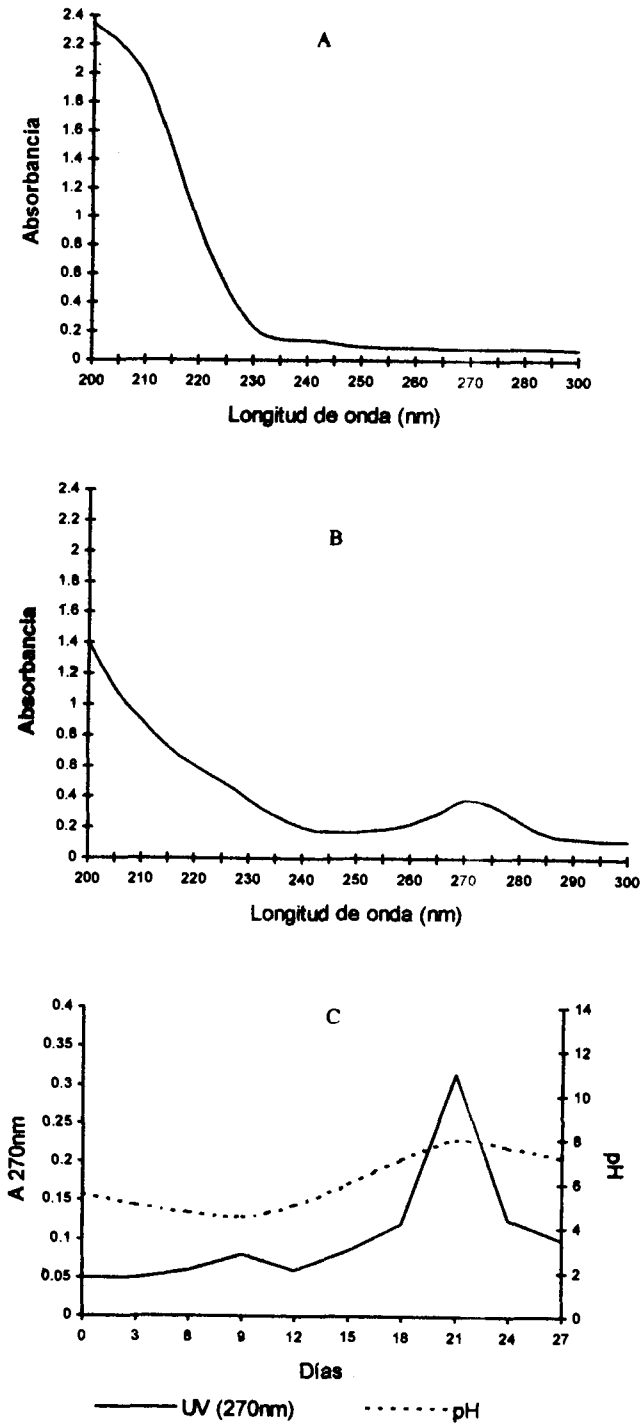
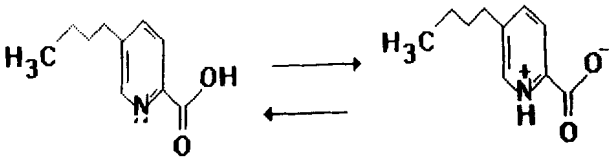


Figura 1. Espectro UV de filtrados de cultivo control (A) y a los 21 días de inoculados (B). Absorbancia a 270 nm y pH de filtrado crudo durante 27 días (C)

Si se analiza la estructura del ácido fusárico, identificado por HPLC como uno de los metabolitos presentes en el medio de cultivo, es lógico asociar el incremento del pH en el medio a la presencia de este compuesto en forma de ion dipolar, característico del anillo piridínico sustituido en el carbono alfa por un grupo carboxílico.



Al estudiar el efecto de las diferentes concentraciones del filtrado sobre callos de piña (Figura 4), se pudo apreciar que concentraciones equivalentes a 10 % y superiores inhibieron el crecimiento de callos del cultivar Cayena lisa (susceptible), mientras que este efecto fitotóxico sobre el cultivar Perolera (resistente) sólo se apreció a concentraciones superiores a 20 % del filtrado.

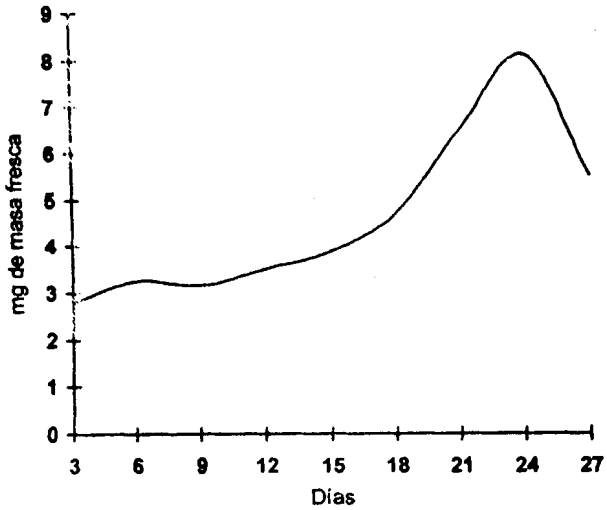


Figura 2. Curva de crecimiento del patógeno en medio líquido durante 27 días

La selección para la resistencia a filtrados crudos del patógeno *in vitro* puede rendir plantas resistentes, aunque no se conozcan las toxinas presentes en los filtrados o el papel que exactamente desempeñan (Binarová *et al.*, 1990). En el presente trabajo queda demostrado un efecto selectivo del filtrado crudo del patógeno frente a callos de piña para concentraciones superiores a 10 % (v/v), así como la presencia de ácido fusárico como uno de los metabolitos presente en el filtrado.

La regeneración de plantas a partir de células seleccionadas frente a filtrados crudos de cultivos o metabolitos purificados del patógeno, puede resultar en un método eficaz para la obtención en un corto período de tiempo de cultivares resistentes a enfermedades.

REFERENCIAS

Arai, M. y M. Takeuchi. Influence of Fusarium wilt toxin(s) on carnation cell. Plant Cell Tissues and Organ Culture 34:287-293, 1993.

Binarová, P. /et al./. Selection for resistence to filtrates of Fusarium spp. in embryogenic cell suspension culture of Medicago sativa L. Plant Cell and Organ Culture 22:191-196, 1990.

Blain, F. /et al./. Phytotoxicity and pathogenicity of Fusarium roseum to red clover. Phytopath. 1:105-108, 1991.

Daub, M. E. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 24:159-186, 1986.

Durbin, R. D. The biochemistry of fungal and bacterial toxins and their modes of action. Biochemical Plant Pathol. 137-160, 1983.

Hashmi, M. H. y U. Thrane. Mycotoxins and other secondary metabolites in species of Fusarium isolated from seeds of Capsicum, Coriander and Fenugreek. Pak J. Bot. 22(2):106-116, 1990.

Jin, H. /et al./. Phytotoxicity of culture filtrate from Fusarium solani, the causal agent of sudden death syndrome of soybean. Plant Disease 80:922-927, 1996a.

Jin, H. /et al./. Characterization and purification of phytotoxin produced by Fusarium solani, the causal agent of soybean sudden death syndrome. Phytopathology 86:277-282, 1996b.

Loffler, H. J. M. y J. R. Mouris. Fusaric acid: phytotoxin and in vitro production by Fusarium oxysporum f.sp. lilii, the causal agent of basal rot in lilies. Neth. J. Pl. Path. 98:107-115, 1992.

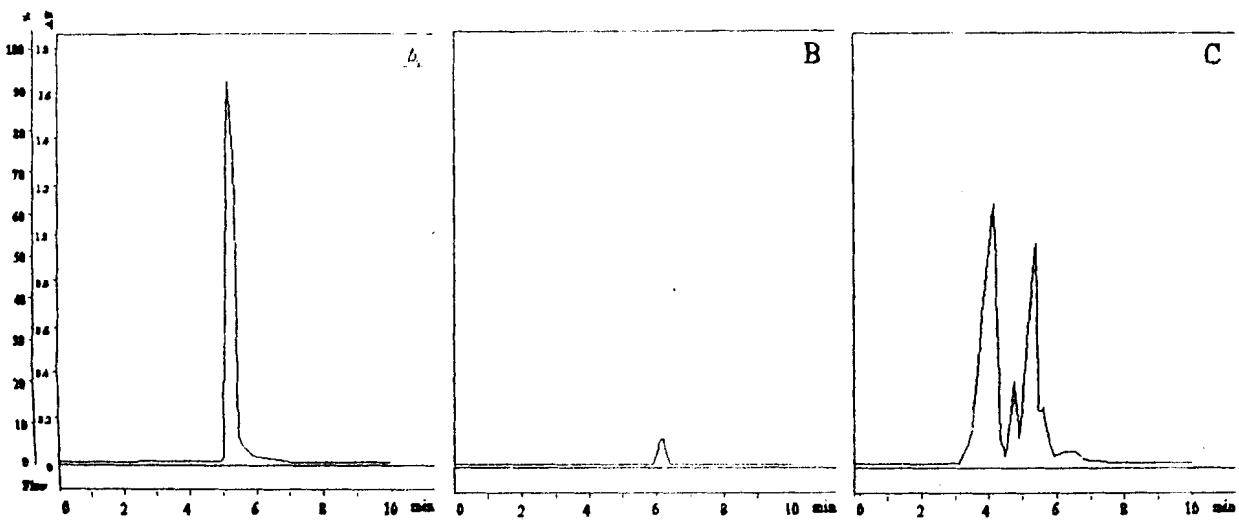


Figura 3. Resolución por HPLC de ácido fusárico puro (A), Caldo Czapek sin inocular (B) e inoculado con una cepa de Fusarium subglutinans durante 21 días (C)

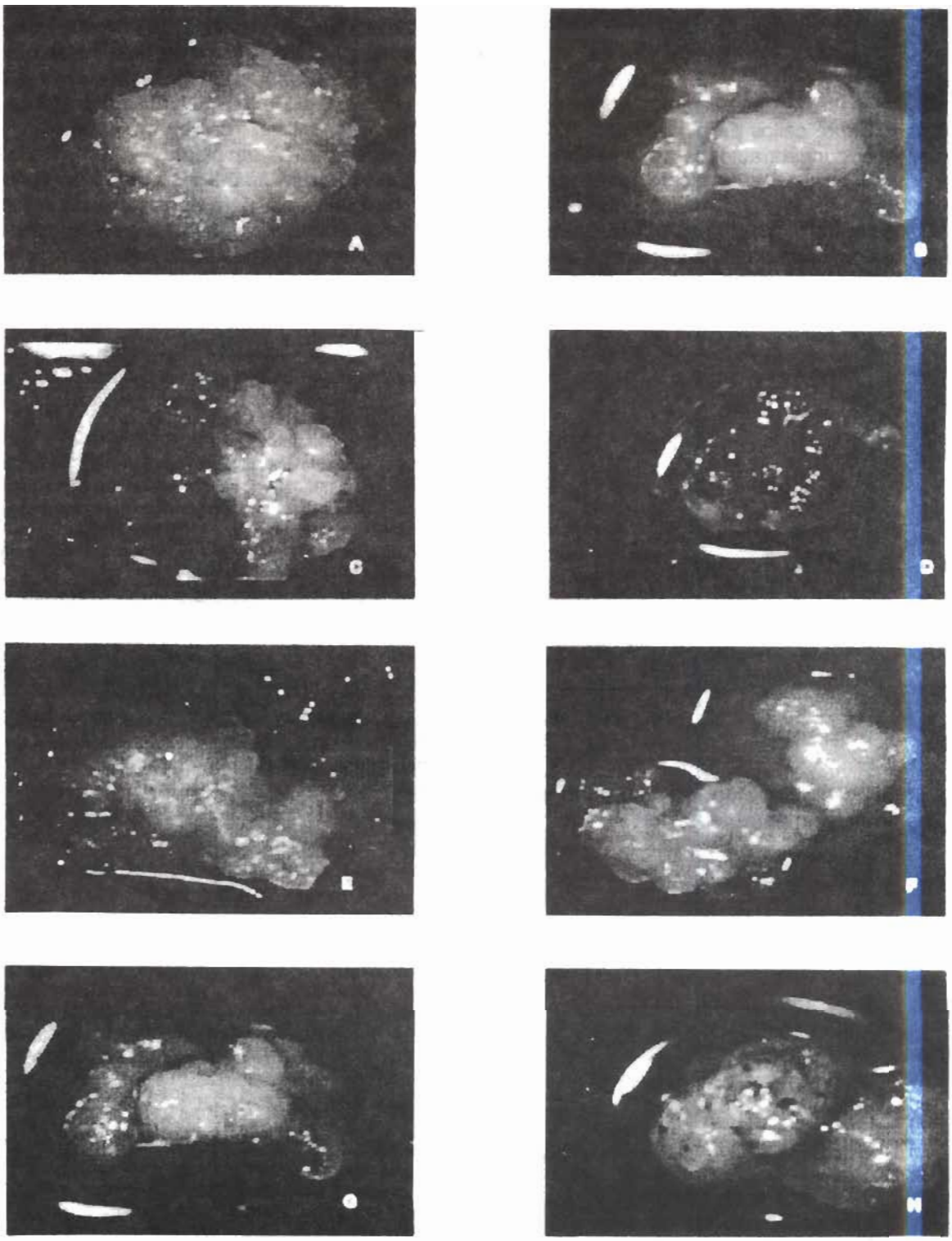


Figura 4. Efecto de filtrados de cultivo obtenidos durante el crecimiento en medio líquido de Fusarium subglutinans sobre callos de piña susceptibles (S) y resistentes (R). Callos S empleados como Control (A). Callos S + 10 % FC (B), Callos S + 20 % FC (C). Callos S + 30 % FC (D). Callos R como control (E). Callos R + 10 % FC (F). Callos R + 20 % (G). Callos R + 30 % (H)

Marasas, W. F. O. /et al./. Toxicity and moniliformin production by four recently described species of Fusarium and two uncertain taxa. Mycopathologia 113:191-197, 1991.

Matsumoto, K. /et al./. Race 1 fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. Euphytica 84:67-71, 1995.

Moretti, A. /et al./. Fertility of Fusarium moniliforme from maize and sorghum related to fumonisin production in Italy. Mycopathologia 131:25-29, 1995.

Pires de Matos, A., X. Mourichon y F. Lapeyre. Reaction of pineapple accesions to inoculation with Fusarium moniliforme var. subglutinans. Fruits 46(6):647-652, 1991.

Pires de Matos, A., X. Mourichon y A. Pinon. Occurrence of Fusarium moniliforme var. subglutinans on pineapple in Bolivia. Fruits 47(1):3, 1992.

Sutherland, M. L. y G. F. Pegg. Purification of a toxin from Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici race 1. Physiological and molecular Plant Pathology 46:243-254, 1995.

Thrane, U. y U. Hansen. Chemical and physiological characterization of taxa in the Fusarium sambucinum complex. Mycopathologia 129:183-190, 1995.

Recibido: 18 de febrero de 1998
Aceptado: 24 de febrero de 1998

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
CURSO TEÓRICO-PRÁCTICO

1998

FITOTECNIA

"Diseño de finca modelo para la agricultura alternativa"

Fecha: 7 al 11 de julio
8 al 12 de diciembre
Duración: 40 horas
Precio: 200.00 USD

Para más información diríjase a:

Dr. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba CP 32700
Telf: (53)(64) 6-3867, 6-3773
Fax: (53)(64) 6-3867
e-mail: inca@ceniai.cu
inca@reduniv.edu.cu