

# **L**a riboflavina induce resistencia en aguacate en contra del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands

*Diana Edith Madrigal Silva, Elda Castro Mercado y Ernesto García Pineda*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH.

## Resumen

La riboflavina (vitamina B2) se sintetiza por las plantas y muchos microorganismos y puede actuar como un activador de resistencia para contrarrestar el estrés biótico. En este trabajo se muestra que la aplicación exógena de riboflavina sobre la raíz de aguacate induce resistencia en contra del oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. La riboflavina aplicada *in vitro* en una concentración de 5 mM a raíces de plántulas inhibió la colonización por *P. cinnamomi*, en comparación con las plántulas control, pero no tuvo efecto alguno en el crecimiento *in vitro* del oomiceto. Extractos de raíces tratadas con riboflavina mostraron actividad inhibitoria sobre el patógeno. Cuando diferentes concentraciones del extracto (50, 100 y 150  $\mu\text{l/ml}$ ) se mezclaron con zoosporas del patógeno ( $1 \times 10^4$  zoosporas/ml) y se analizaron al microscopio 6 días después, se observó una morfología alterada de las hifas o una disminución en la producción de clamidosporas, así como restos de hifas, sugiriendo un efecto tóxico sobre el patógeno. Estos resultados indican que los extractos de raíces de aguacate tratadas con riboflavina afectan la formación de clamidosporas y la estructura del micelio de *P. cinnamomi*.

**Palabras clave:** Aguacate, *Phytophthora cinnamomi*, riboflavina

## Abstract

Riboflavin (vitamin B2) is synthesized by plants and many microorganisms and can act as an activator of plant resistance against biotic stress. In this work, we show that exogenous application of riboflavin on avocado roots induces resistance against *Phytophthora cinnamomi*. Riboflavin applied at a concentration of 5 mM to roots of avocado seedlings *in vitro* inhibited the colonization by *P. cinnamomi*, compared to control plants. Riboflavin itself had no effect on growth of the oomycete. Root extracts of tissue treated with riboflavin showed inhibitory activity on mycelia of *P. cinnamomi*. When zoospores ( $1 \times 10^4$  zoospores/ml) were incubated with different concentrations (50, 100 and 150  $\mu$ l/ml) of root extract and analyzed 6 days later with a microscope, an altered morphology of hyphae was observed and the production of chlamydospores was affected. Moreover, debris of hyphal material was distinguished in the assays, suggesting a toxic effect of the extract on the pathogen hyphae. These results show that root extracts of avocado treated with riboflavin affect the formation of chlamydospores and the integrity of mycelium in *P. cinnamomi*.

**Keywords:** Avocado, *Phytophthora cinnamomi*, riboflavin.

## Introducción

El tratamiento de plantas con patógenos virulentos o avirulentos, microorganismos no patógenos, fragmentos de pared celular, extractos de plantas y compuestos químicos, puede conducir a la inducción de respuestas de defensa (Walters et al., 2005). Esta resistencia inducida rara vez conduce a un control completo sobre la proliferación de los patógenos después de una subsecuente inoculación, pero resulta en una reducción en el número y tamaño de la lesión (Walters et al., 2005; Vallard y Goodman, 2004).

La riboflavina es una vitamina producida por las plantas y los microorganismos que participa en diversos procesos fisiológicos (Wolinsky y Driskell, 1997). Está involucrada en la autooxidación (Packer et al., 1996) y en la peroxidación (Zubay 1998), ambos procesos afectan la producción de especies reactivas de oxígeno y la respuesta hipersensible (Álvarez et al., 1998). La aplicación foliar de riboflavina controla efectivamente algunas enfermedades del tabaco (Dong et al., 1995) y reduce la proliferación del moho de las plantas de fresa en combinación con metionina, iones metálicos y surfactantes (Wang y Tzeng, 1998). Sin embargo, la función de la riboflavina en las reacciones de defensa es poco conocida puesto que sólo se le ha estudiado en un número limitado de interacciones planta-patógeno, las cuales sugieren que la riboflavina puede funcionar como un estimulador de resistencia o como mediador de la transducción de las señales de defensa.

*Phytophthora cinnamomi* causa la enfermedad de la pudrición de la raíz en plantas de aguacate (*Persea americana* Mill) y representa la enfermedad más destructiva e importante

de este cultivo a nivel mundial. El patógeno ataca a las plantas durante todas sus etapas de crecimiento, incluyendo a las que son producidas en los viveros y destruye las raíces pequeñas, las cuales se tornan negras y quebradizas y eventualmente mueren, disminuyendo la capacidad de captación de agua y nutrientes (Pegg et al., 2002). Los síntomas en la parte aérea no llegan a observarse hasta que la infección es avanzada (Zentmyer 1980). Las enfermedades ocasionadas por *Phytophthora* se consideran recalcitrantes, ya que la aplicación de fungicidas sistémicos convencionales protegen o erradican las infecciones de las hojas o los tallos, pero tienen poca actividad en contra de las infecciones de la raíz causadas por *Phytophthora*, por lo tanto la exploración de los mecanismos de defensa inducidos en la planta mediante la aplicación de estimuladores representan una opción para el control de esta enfermedad.

En este trabajo se investigaron los efectos de la riboflavina aplicada exógenamente a raíces de aguacate para inducir resistencia en contra del oomiceto *P. cinnamomi* y se analizó el efecto de extractos de raíz inducidos con riboflavina sobre el crecimiento e integridad del micelio del patógeno.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

Estos estudios fueron realizados con plántulas de aguacate criollo (*Persea americana* Mill var *drymifolia*), obtenidas de invernaderos comerciales de la ciudad de Uruapan, Michoacán, las cuales son susceptibles a la infección por *P. cinnamomi*. El aislado de *P. cinnamomi* fue amablemente proporcionado por el Dr. Rafael Salgado Garciglia, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, de la UMSNH, éste se obtuvo de plantas de aguacate que mostraban los síntomas característicos de la enfermedad. El patógeno se mantuvo en medio agar-jugo V8 en oscuridad a 24 °C. Se prepararon cultivos frescos y se crecieron a 24 °C en oscuridad durante 7 días para preparar el inóculo.

### Reactivos

Todos los compuestos químicos fueron obtenidos de la compañía Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) y fueron de la más alta pureza (>99%).

### Producción de zoosporas

Se produjeron esporangios y zoosporas de *P. cinnamomi* transfiriendo discos de 5 mm de diámetro, de las orillas de un cultivo de 7 días de edad, a 10 ml de medio líquido V8, e incubado durante 3 días en oscuridad (Menyonga y Tsao, 1996). El micelio se lavó tres veces con agua destilada estéril antes de la incubación en una solución de extracto de suelo para la liberación de las zoosporas. Se preparó una suspensión de zoosporas incubando el

micelio en 5-10 ml de extracto de suelo a 24 °C bajo luz fluorescente durante 2 días para estimular la producción de esporangios (Ayers y Zentmyer, 1971). El micelio se enjuagó tres veces con agua desionizada estéril y se incubó en 5 ml de agua desionizada estéril a 4 °C durante 30 minutos. Se removió de la incubación en frío y se incubó a 24 °C durante 30 minutos. Las zoosporas liberadas fueron cuantificadas al microscopio en un hemocitómetro.

### **Tratamiento *in vitro* con riboflavina**

Cuatro segmentos de raíz de aguacate (0.5 cm) se sumergieron en 10 ml de una solución de riboflavina 5 mM durante 4 horas. Después se sumergieron en una suspensión de zoosporas ( $1 \times 10^4$  zoosporas /ml) de *P. cinnamomi*, se incubaron durante 24 h y se transfirieron a un medio selectivo para *Phytophthora* spp conteniendo 10 mg de piramicina, 250 mg de ampicilina, 10 mg de rifampicina, 100 mg de pentacloronitrobenzoceno, y 75 mg de himexazol por litro de medio (Gess y Coffey, 1989). Después de 3 días, se analizó la infección con base en el crecimiento de *P. cinnamomi* en la raíz y en el medio de cultivo. Raíces tratadas con agua fueron utilizadas como control.

### **Ensayo de sensibilidad *in vitro***

Se adicionó riboflavina (5 mM) o agua a placas Petri que contenían medio agar- jugo V8 (15 g/L). En las placas se colocaron discos de agar (5 mm de diámetro) que contenían micelio de *P. cinnamomi* de un cultivo de 7 días de crecimiento. El crecimiento del micelio se midió cada 24 h hasta que alcanzó el margen de la placa (Schouten et al., 2002).

### **Extracción del material vegetal**

Raíces de plantas (10 g) se molieron con nitrógeno líquido en un mortero. El material pulverizado se transfirió a un matraz Erlenmeyer conteniendo 800 ml de metanol al 80%. La mezcla se agitó durante 24 h en un agitador a 125 rpm a 25 °C. Se removió el solvente por evaporación al vacío en un rotavapor a 45-50 °C. El extracto final se resuspendió en 1 ml del mismo solvente (Rodríguez et al., 2004). La cantidad total de extracto se obtuvo restando el peso del recipiente al del recipiente más el extracto cuyo solvente fue evaporado en su totalidad.

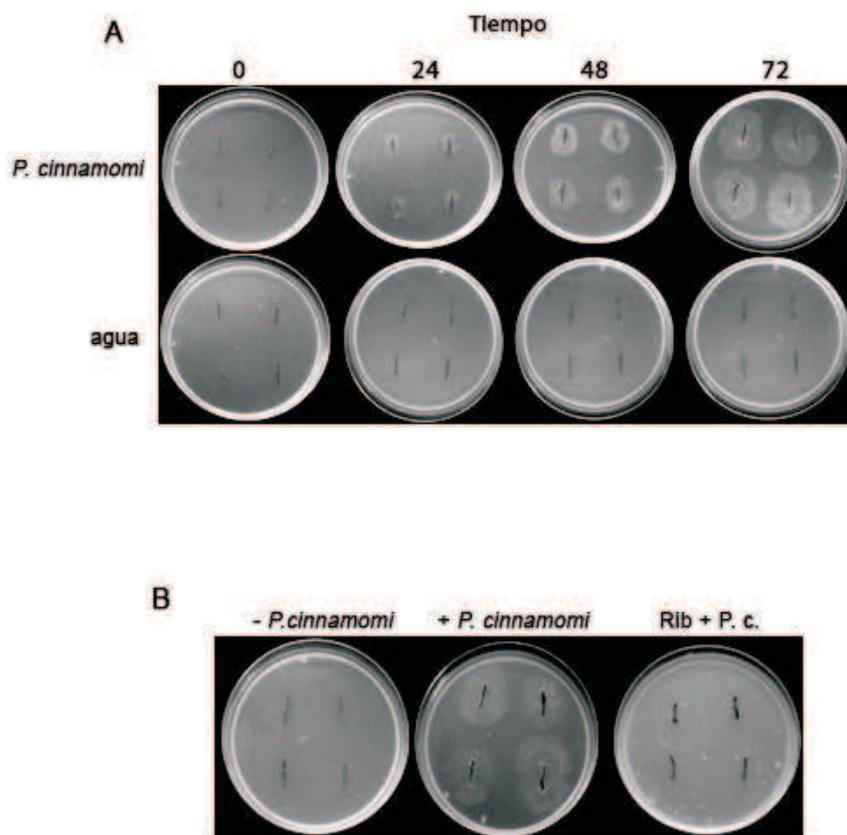
### **Bioensayos con el extracto**

Se utilizaron cajas de Petri con agar jugo V8 a las cuales se les hizo una perforación de 10 mm de diámetro en el centro de la caja. Se colocó un volumen de 50 µl del extracto vegetal (~70 µg de peso) en el orificio de la placa y se permitió que se secase durante 30 min. Como control, el mismo volumen de agua o metanol se aplicó a las cajas de Petri. Posteriormente, dos discos de agar de 15 mm de diámetro de un cultivo de *P. cinnamomi* se colocaron en extremos opuestos, a una distancia de 1.5 cm del centro de la caja. Las placas se incuba-

ron a 25 °C en oscuridad y el crecimiento del patógeno se analizó diariamente hasta que las dos colonias confluyeron en el tratamiento control (Rodríguez et al., 2004).

### Efecto del extracto sobre la germinación de las zoosporas

Diferentes volúmenes del extracto (50 µl = 70 µg de peso, 100 µl = 140 µg de peso, y 150 µl = 210 µg de peso de extracto) se mezclaron con una suspensión de zoosporas ( $1 \times 10^4$  zoosporas /ml) en un tubo Eppendorf. Se analizó la germinación de las zoosporas 6 días después de la incubación a 24 °C en un microscopio (Ho et al., 2007). Se analizaron cuatro réplicas para cada tratamiento y todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, obteniendo resultados similares.

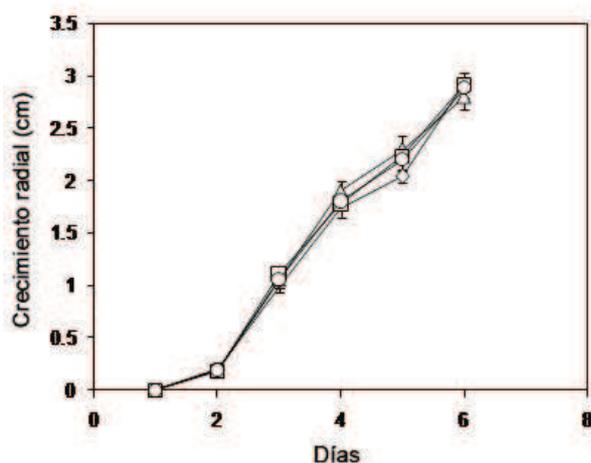


**Figura 1.** Efecto de la riboflavina sobre la colonización de la raíz por *P. cinnamomi*. **A.** Colonización durante diferentes tiempos (horas). **B.** Efecto de la riboflavina sobre la colonización de la raíz. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces con resultados similares.

## Resultados

### Caracterización de la infección de raíces de aguacate con *P. cinnamomi*

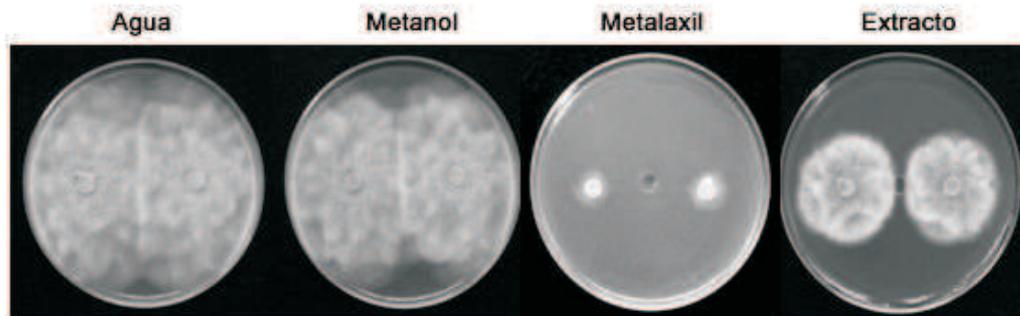
Se analizó de manera temporal la infección *in vitro* del tejido de raíz con zoosporas de *P. cinnamomi* (Fig. 1A). El crecimiento del micelio se observó 24 h después de la infección y se incrementó a las 72 h. No se observó infección en raíces que fueron pre-tratadas durante 4 h con 5 mM de riboflavina (Fig. 1B). Se detectó la presencia del patógeno en las raíces pre-tratadas con riboflavina, sin embargo, su abundancia fue menor que en el tejido control infectado (dato no mostrado). Este resultado sugiere que el tratamiento con riboflavina retarda el crecimiento del micelio. Además, se observó que diferentes concentraciones de riboflavina no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *P. cinnamomi* (Fig. 2). De acuerdo con estos resultados, es factible que las respuestas de defensa en la raíz de aguacate se hayan estimulado por el tratamiento con riboflavina.



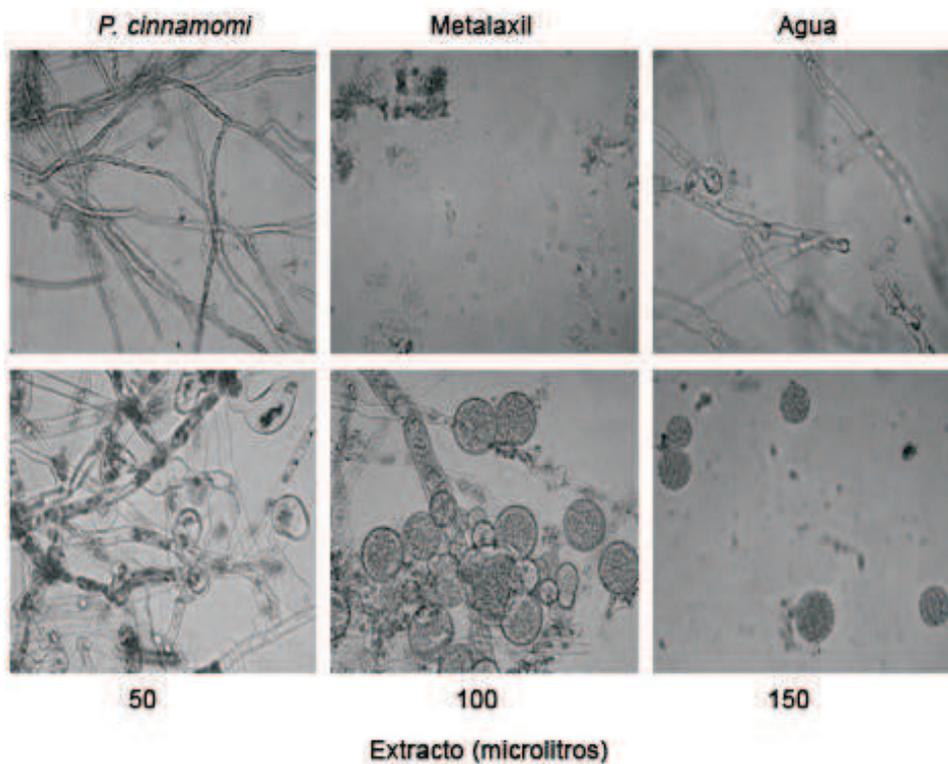
**Figura 2.** Efecto de la riboflavina sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*. Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres réplicas. -◇- control agua; -Δ- rib 5 mM; -□- rib 10 mM; -○- rib 15 mM.

### Efecto *in vitro* de extractos de *P. cinnamomi*

Se realizaron experimentos para analizar la posible presencia de compuestos de defensa en los extractos de tejido de raíz inducido con riboflavina. El extracto metanólico se utilizó para realizar bioensayos *in vitro* con *P. cinnamomi* (Fig. 3). El análisis visual de la actividad anti-oomiceto del extracto sobre *P. cinnamomi* indica que el extracto contiene compuestos que alteran el patrón de crecimiento radial de las hifas, mientras que los extractos de raíz control, extraídos con agua o metanol, no tuvieron efecto sobre el crecimiento. Se observó una inhibición total utilizando metalaxil, utilizado como control positivo de inhibición, el cual es un fungicida sistémico utilizado para el control de la enfermedad provocada por este oomiceto.



**Figura 3.** Actividad de los extractos metanólicos sobre *P. cinnamomi*. El crecimiento de *P. cinnamomi* se evaluó diariamente hasta que los bordes de crecimiento de los controles se tocaron. Los experimentos se repitieron al menos tres veces con asimilares resultados.



**Figura 4.** Efecto de los extractos metanólicos sobre el crecimiento del micelio de *P. cinnamomi*. Diferentes volúmenes del extracto se mezclaron con una suspensión de zoosporas ( $1 \times 10^4$  zoosporas / ml), se incubaron durante 6 días y las muestras se analizaron con un microscopio de luz. Los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares. Amplificación 40X.

## Efecto de los extractos sobre la germinación de esporas

Se mezclaron zoosporas con varias concentraciones del extracto y se analizó su efecto sobre la germinación y el crecimiento del micelio 6 días después de la incubación (Fig. 4). El extracto no afectó la germinación de las zoosporas, pero sí alteró la morfología de las hifas cuando se incrementó el volumen de extracto adicionado. Así, con 50  $\mu$ l la alteración más obvia fue la formación de estructuras similares a burbujas o abultamientos en las hifas, con 100  $\mu$ l se observó una gran cantidad de estructuras semejantes a clamidosporas y con 150  $\mu$ l no se observaron estructuras de micelio definidas y sólo una baja cantidad de estructuras semejantes a clamidosporas. Además, se pudieron distinguir restos de hifas, sugiriendo un probable rompimiento del micelio provocado por la adición del extracto.

## Discusión

En este trabajo reportamos que la aplicación exógena de riboflavina induce resistencia en raíces de aguacate en contra de *P. cinnamomi*. Un extracto metanólico obtenido de la raíz de aguacate tratada con riboflavina mostró una actividad inhibitoria sobre *P. cinnamomi*, afectando la morfología de las hifas.

La riboflavina es una vitamina producida por las plantas y los microorganismos. Es el precursor de la flavina de los cofactores flavina mononucleótido y flavina adenina dinucleótido, los cuales están involucrados en diferentes procesos fisiológicos (Fisher y Bacher, 2006). Está involucrada en reacciones de antioxidación (Upreti et al., 1991) y peroxidación (Ahn et al., 2005), ambos procesos afectan la producción de especies reactivas de oxígeno durante la explosión oxidativa y la subsecuente respuesta hipersensible (Delledone et al., 1998). Se ha reportado que en discos de hojas de frijol pre-tratadas con riboflavina se induce la acumulación de peróxido de hidrógeno 4 h después de la inoculación con el patógeno. También se detectó una estimulación de la actividad de lipooxigenasa antes de las 48 h de la inoculación con patógeno. Estos resultados sugieren que la riboflavina puede estimular a la planta de frijol para acumular peróxido de hidrógeno y activar a la lipooxigenasa cuando es desafiada por patógenos (Azami-Sardooei et al., 2010). Además, la expresión de genes relacionados con la patogénesis en plantas de tabaco y *Arabidopsis*, inducida por riboflavina, sugiere que se activan rutas de señalización que conducen a la resistencia (Zhang et al., 2009). El inhibidor K252a de la proteína cinasa y la mutación en el gene *NIM1/NPR1*, el cual controla la transcripción de los genes de defensa, afectan la respuesta a la riboflavina. Así, parece que la resistencia mencionada implica señalización vía proteínas cinasas y la funcionalidad de *NIM1/NPR1* (Dong y Beer, 2000).

Por otro lado, en nuestro trabajo se observó la inducción de estructuras semejantes a clamidosporas cuando el extracto metanólico de raíces tratadas con riboflavina se adiciona a una suspensión de zoosporas. *P. cinnamomi* es un patógeno que vive en el suelo y en los tejidos de plantas y bajo condiciones ambientales adversas el patógeno puede producir clamidosporas (Downer et al., 2001). Estas estructuras tienen una pared celular gruesa y reser-

vas de lípidos que le permiten sobrevivir en el sustrato por períodos de tiempo considerables. Cuando las condiciones ambientales son favorables, las clamidosporas germinan produciendo micelio y esporangios. Los esporangios maduran y liberan zoosporas, las cuales infectan a las raíces. Los esporangios y las clamidosporas se forman en el micelio de las raíces infectadas y el ciclo de infección continúa en las plantas adyacentes (Pegg et al., 2002). Por los efectos observados sobre el micelio después de la adición del extracto de aguacate de raíces tratadas con riboflavina, es probable que algún (os) compuestos tóxicos, probablemente fitoalexinas, se hayan producido y pudieran haber causado un efecto en las clamidosporas a bajas concentraciones del extracto. En altas concentraciones parece incrementarse su toxicidad porque no se distinguieron hifas íntegras, sugiriendo algún blanco potencial sobre la estructura de la membrana plasmática, como se ha descrito para las fitoalexinas (Mace y Stipanovic, 1995; Roggers et al., 1996; Grayer y Kokubun, 2001). La identificación del (os) compuesto (s) presentes en el extracto de aguacate responsables de los efectos tóxicos hacia *P. cinnamomi* actualmente está en proceso.

### Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Consejo de la Investigación Científica de la UMSNH, México. DEMS recibió apoyo por parte del CONACYT con una beca para la realización de su tesis de Maestría en Ciencias en Biología Experimental en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

### Bibliografía

- Ahn, I.-P., Kim, S y Y.-H. Lee. 2005. Vitamin B1 functions as an activator of disease resistance. *Plant Physiol.* 138:1505-1515.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. y C. Lamb. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92:773-784.
- Ayers, W.A. y G.A. Zentmyer. Effect of soil solution and two soil pseudomonads on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 61:1188-1193.
- Azami-Sardooei, Z., Franca, S.C., De Vleeschauwer, D. y M. Hofte. 2010. Riboflavin induces resistance against *Botrytis cinerea* in bean, but not in tomato, by priming for a hydrogen peroxide-fueled resistance response. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 75:23-29.
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S. y A. Kohler. 2001. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 113-119.
- Delledone, M., Xia, Y., Dixon, R.A. y C. Lamb. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588.
- Dong, H., y S. V. Beer. 2000. Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology* 90:801-811.

- Dong, H., Liu, A., Wang, Y., Liu, B., Fan, H., Liu, G., Wang, R., Chen, J., Sun, Y., Zhang, L., Qian, Y., Gao, Z., Xu, Q., Sun, X., y C. Sang. 1995. Control of brown spot by induced resistance in tobacco: Preparation SRS2, its functions to control the disease and to improve qualitative and economic properties of the cured leaves. Pages 422-427 in: Induced Resistance Against Diseases in Plants. H. Dong, ed. Science Press, Beijing.
- Downer, A.J., Menge, J.A. y E. Pond. 2001. Effects of cellulytic enzymes on *Phytophthora*. *Phytopathology*. 91:839-846.
- Fischer, M. y A. Bacher. 2006. Biosynthesis of vitamin B<sub>2</sub> in plants. *Physiol. Plant*. 126:304-318.
- Gess R, y M.D. Coffey. 1989. Evaluation of a strain of *Myrothecium roridum* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 79:1079–1084.
- Grayer, R.J y T Kokubu. 2001. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 56: 253-263
- Ho, W.C., Wu, T.Y., Su, H.J., y W.H. Ko. 2007. Effect of oriental medicinal plant extracts on spore germination of *Alternaria brassicicola* and nature of inhibitory substances from speed weed. *Plant Dis*. 91:1621-1624.
- Mace, M.E., y R.D. Stipanovic. 1995. Mode of action of the phytoalexin desoxyhemigossypol against the wilt pathogen, *Verticillium dahlia*. *Pesticide Biochem. Physiol.* 53:205-209.
- Menyonga, J.M. y P.H. Tsao. 1966. Production of zoospore suspensions of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 56:359-360.
- Packer, L., Podda, M., Kitazawa, M., Thiele, J., Saliou, C., Witt, E., y M. G. Traber. 1996. Vitamin E and the metabolic antioxidant network. Pages 283-304 in: *Molecular Mechanisms of Signaling and Membrane Transport*. K. W. A. Wirtz, ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Pegg, K.G., Coates, L.M., Korsten, L. y R.M. Harding. 2002. Foliar, fruit and soil borne disease. In: *The Avocado. Botany, production and uses*. Ed by AW Whiley, B Schaffer, BN Wolstenholme. CABI Publishing, New York, USA.
- Rodrigues, F.Á., McNally, D.J., Datnoff, L.E., Jones, J.B., Labbé, C., Benhamou. N., Menzies. J.G. y R.R. Bélanger. 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: A potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94:177-183.
- Rogers, E.E., Glazebrook, J. y F.M. Ausubel. 1996. Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:748-757.
- Schouten, A., Tenberge, K.B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, L., Williamson, B. y J.A.L. van Kan. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 3:227–238.

- Upreti, K.K., Das, M. y S.K. Khanna. 1991. Role of antioxidants and scavengers on argemone oil-induced toxicity in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20:531-537.
- Vallard, G.E. y R.M. Goodman. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44:1920-1934.
- Walters, D. R., Newton, A. C. y G. D. Lyon. 2005. Induced resistance: Helping plants to help themselves. *Biologist* 52:28-33.
- Wang, S. y D. D. Tzeng. 1998. Methionine-riboflavin mixtures with surfactants and metal ions reduce powdery mildew infection in strawberry plants. *J. Am. Soc. Sci.* 123:987-991.
- Wolinsky, I. y J. A. D. Driskell. 1997. *Sports Nutrition: Vitamins and Trace Elements*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Zhang, S., Yang, X., Sun, M., Sun, F., Deng, S. y H. Dong. 2009. Riboflavin-induced priming for pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *J. Int. Plant Biol.* 51:167-174.