

Respuestas Genéticas Provocadas por el Tratamiento con Isotiocianatos en Hongos del Género *Alternaria*

Genetic Responses Induced by Isothiocyanates Treatment on the Fungal Genus *Alternaria*

María Elena Báez Flores, Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Culiacán, Sin., CP 80000, México; **Rosalba Troncoso Rojas y Martín Ernesto Tiznado Hernández**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Hermosillo, Son., CP 83000, México. Correspondencia: tiznado@ciad.mx

(Recibido: Julio 16, 2008 Aceptado: Noviembre 12, 2008)

Báez Flores, M. E., Troncoso Rojas, R. y Tiznado Hernández, M. E. 2011. Respuestas Genéticas Provocadas por el Tratamiento con Isotiocianatos en Hongos del Género *Alternaria*. Revista Mexicana de Fitopatología 29:61-68.

Resumen. Los isotiocianatos son compuestos naturales con potente actividad antifúngica producidos por *Brassicas* como parte de su sistema de defensa. Estos compuestos representan una alternativa a la utilización de compuestos químicos para el control de infecciones fúngicas en productos agrícolas. El objetivo de la revisión fue analizar los estudios publicados acerca de los mecanismos moleculares de la respuesta de hongos al efecto tóxico de los isotiocianatos. Los estudios en *Alternaria brassicicola* demuestran la inducción de genes cuyos productos cumplen funciones en estrés oxidativo (citocromo P450, tioredoxinas y oxidoreductasas), así como en la excreción de isotiocianatos (glutación-S-transferasas y transportadores ABC). El hongo *A. brassicicola* es un patógeno especializado en *Brassicas*, mientras que *Alternaria alternata* es un patógeno generalista. Sin embargo, en *A. alternata* también se reportó la inducción de un gen codificando a un transportador ABC. En base a los datos de la revisión se puede concluir que el mecanismo de respuesta a isotiocianatos en hongos incluye la formación de un conjugado isotiocianato-glutación que es excretado mediante un transportador ABC. Se sugiere que la utilización de isotiocianatos en combinación con inhibidores de transportadores ABC, podría evitar la resistencia fúngica y constituiría un tratamiento amigable con el ambiente y la salud humana.

Palabras clave adicionales: *Brassicas*, fungicidas, mecanismo molecular de respuesta, transportador ABC, glutación-S-transferasa.

Uno de los retos para aumentar el suministro mundial de alimentos, es el de reducir las pérdidas post-cosecha de frutas

Báez Flores, M. E., Troncoso Rojas, R. and Tiznado Hernández, M. E. 2011. Genetic Responses Induced by Isothiocyanates Treatment on the Fungal Genus *Alternaria*. Revista Mexicana de Fitopatología 29:61-68.

Abstract. The isothiocyanates are natural compounds with potent antifungal activity produced by *Brassicac*s as part of their defense system. These compounds represent an alternative to the utilization of chemical compounds for controlling fungal infections in agricultural products. The objective of the review was to analyze the published literature including studies of the fungal molecular mechanisms responding to the toxic effect of isothiocyanates. The studies in *Alternaria brassicicola* show the induction of genes playing a role in oxidative stress (cytochrome P450, thioredoxins and oxidoreductases), and genes playing a role in the elimination of isothiocyanates from the cell (glutathione-S-transferases, and ABC transporters). The fungus *A. brassicicola* is a pathogen specialized in *Brassicac*s, while *Alternaria alternata* is a generalist pathogen. However, in *A. alternata* it was also reported the induction of a gene encoding an ABC transporter. Based on the reviewed data, it can be concluded that the fungi response mechanism to isothiocyanates consists in the formation of an isothiocyanate-glutathione conjugate which is secreted by an ABC transporter. It is suggested that the utilization of isothiocyanates in combination with ABC transporter inhibitors, could avoid the fungal resistance and it could constitute a safe treatment for the environment as well as for human health.

Additional keywords: *Brassicac*s, fungicides, response molecular mechanism, ABC transporter, glutathione-S-transferase.

One of the challenges to increase the food world supply is to reduce the postharvest losses of fruits and vegetables which

y hortalizas que pueden variar desde un 10 hasta un 50% de la producción total (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2003). Una de las causas principales de enfermedades post-cosecha en frutas y hortalizas son los hongos fitopatógenos (Sharma *et al.*, 2009). El método utilizado para controlar las enfermedades fúngicas se basa, casi exclusivamente, en la utilización de productos químicos sintéticos. Sin embargo, en las últimas décadas, los esfuerzos se han dirigido a obtener una mejor comprensión de los efectos biológicos de los compuestos aislados de plantas que tienen una potencial aplicación en el control de enfermedades y plagas, debido a la reciente tendencia a utilizar alternativas más seguras para el control de hongos y a reducir al mínimo la dependencia de pesticidas artificiales (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2007). Se espera que el uso de compuestos naturales tenga un menor impacto sobre los ecosistemas, ya que a diferencia de los productos químicos sintéticos, éstos son biodegradables y no se acumulan en el medio ambiente. Los Isotiocianatos (ITCs) se encuentran entre los compuestos alternativos debido a su potente actividad fungicida (Tiznado-Hernández y Troncoso-Rojas, 2006), así como a sus efectos positivos sobre la salud humana (Vig *et al.*, 2009). Se ha reportado que *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissler es eliminado por medio de bajas concentraciones de 2-propenil-isotiocianato (Troncoso-Rojas *et al.*, 2005). Sin embargo, el modo de acción del ITCs no se ha podido entender por completo (Manici *et al.*, 1997). Por otra parte, algunas otras especies del género *Alternaria* son capaces de infectar especies de *Brassica* spp., los cuales utilizan ITCs como mecanismo de defensa, tales como *A. brassicicola* y *A. brassicae* (Sigareva y Earle, 1999). La posibilidad de los hongos de desarrollar resistencia contra ITCs hace que sea importante entender las bases moleculares de este fenómeno, de tal forma que sea posible conocer los genes que son inducidos en respuesta a estos compuestos naturales y, en consecuencia, cuáles son las proteínas involucradas en el mecanismo de defensa de los hongos. Por consiguiente, el objetivo de esta revisión es analizar la literatura sobre las bases moleculares de la respuesta adaptativa de hongos del género *Alternaria* a los efectos tóxicos del ITC.

Isotiocianatos y su actividad biocida. Las plantas producen metabolitos secundarios, los cuales desempeñan distintas funciones entre las que cabe citar: participación en el mecanismo de defensa contra los depredadores, o como sustancias de reserva. Entre estos metabolitos están los glucosinolatos (GLSs), que son productos naturales que contienen nitrógeno y azufre, presentes principalmente en algunas especies de la familia *Brassicaceae*, tales como: mostaza, brócoli, col, coliflor, rábano, nabo y canola (Fahey *et al.*, 2001). Los GLSs no son compuestos tóxicos *per se*; sin embargo, la pérdida de la compartimentalización celular por daño en los tejidos puede unir las moléculas de GLSs con la enzima mirosinasa, que hidroliza a los GLSs, produciéndose así una aglicona inestable que se reorganiza, de forma espontánea, en compuestos biológicamente activos como tiocianatos, ITCs y nitrilos, dependiendo de la concentración de hierro en las células, la sustitución de las cadenas laterales y el pH de la célula (Wisttock y Halkier, 2002). De los

can vary from 10 up to 50% of the total production (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2003). Phytopathogenic fungi are one of the main causes of postharvest diseases in fruits and vegetables (Sharma *et al.*, 2009). The approach used to control the fungal diseases is based almost entirely on the utilization of synthetic chemical products. However, in the last decades, due to the recent trend to the use of more safe alternatives to fungi control, efforts had been directed to get a better understanding of the biological effects of compounds isolated from plants, which have a potential application in pest and disease control, minimizing dependence on artificial pesticides (Troncoso-Rojas and Tiznado-Hernández, 2007). The use of natural compounds is expected to have a minor impact on the ecosystems. Unlike synthetic chemicals, they are biodegradable and do not accumulate in the environment. Among the alternative compounds, due to their potent fungicidal activity (Tiznado-Hernández and Troncoso-Rojas, 2006) as well as their positive effects on human health (Vig *et al.*, 2009), are the isothiocyanates. Indeed, it was reported that *Alternaria alternata* (ITCs.:Fr.) Keissler is killed by low concentrations of 2-propenyl-isothiocyanate (Troncoso-Rojas *et al.*, 2005). However, the ITCs mode of action is not completely understood (Manici *et al.*, 1997). On the other hand, some other species of *Alternaria* genus are able to infect species of *Brassica* spp. which utilizes isothiocyanates as a defense mechanism e.g. *A. brassicicola*, and *A. brassicae* (Sigareva and Earle, 1999). The possibility of fungi developing resistance against ITCs makes important to understand the molecular basis of this phenomena, e.g. what genes are induced in response to these natural compounds and consequently, what kind of proteins are involved in the fungal defence mechanism. Because of the above mentioned, the aim of this review is to analyze in the literature about the molecular basis of the fungal adaptive response to the ITCs toxic effect.

Isothiocyanates and their biocide activity. The plants produce secondary metabolites playing roles in either the defense mechanisms against predators or as reserve substances. Among these metabolites are the glucosinolates (GLSs), natural products containing nitrogen and sulfur, present mainly in some species of the *Brassicaceae* family, namely: mustard, broccoli, cabbage, cauliflower, radish, turnip, and canola (Fahey *et al.*, 2001). The GLSs itself are not toxic compounds, however the loss of cell compartmentalization by tissue damage can bring together the GLSs molecules and the myrosinase enzyme, which hydrolyze GLSs producing an unstable aglycone that spontaneously rearrange into biologically active compounds like thiocyanates, nitriles and isothiocyanates depending upon the cell iron concentration, side chain substitution and the cell pH (Wisttock and Halkier, 2002). Out of these compounds, the isothiocyanates have a wider biocide activity including inhibition of fungi (Mayton *et al.*, 1996), bacteria (Tajima *et al.*, 1998), nematodes (Kermanshai *et al.*, 2001), insects (Ratzka *et al.*, 2002) and weed seeds (Brown and Morra, 1995). The mechanism by which ITCs inhibit microorganism and fungal growth is not well known. Some hypotheses propose that ITCs cause inactivation of

compuestos mencionados, los ITCs tienen la más amplia actividad biocida, incluyendo la inhibición de hongos (Mayton *et al.*, 1996), bacterias (Tajima *et al.*, 1998), nemátodos (Kermanshai *et al.*, 2001), insectos (Ratzka *et al.*, 2002) y semillas de maleza (Brown y Morra, 1995). El mecanismo por el cual los ITCs inhiben el crecimiento de hongos y microorganismos aún no se conoce bien. Algunas hipótesis proponen que los ITCs son la causa de inactivación de las enzimas intracelulares por medio de la degradación oxidativa de los puentes disulfuro, de la inhibición de enzimas metabólicas por la acción del radical tiocianato y la acción desacopladora de la fosforilación oxidativa. Al parecer, la alta reactividad de los ITCs se debe principalmente a la fuerte naturaleza electrofílica del grupo funcional Isotiocianato (-NCS) (Kroll *et al.*, 1994). Experimentos *in vitro* demostraron que el alil-isotiocianato puede formar enlaces covalentes con el grupo de azufre reactivo de glutatión (Kawakishi y Kaneko, 1987), así como con los grupos amino y sulfhidrilo libres de los aminoácidos (Cejpek *et al.*, 2000), lo cual sugiere que los ITCs pueden reaccionar químicamente con las proteínas a través de los grupos aminos y los grupos sulfhidrilo libres que están presentes en los grupos laterales de los residuos de aminoácidos, tales como la lisina, la arginina y la cisteína. La actividad antifúngica de los ITCs parece ser más al azar que específica, ya que podría reaccionar con cualquier proteína de la célula fúngica. Esta naturaleza no específica del sitio de acción de los ITCs hace poco probable una mutación que podría inducir un fenotipo de resistencia en los hongos, tal como ha sido observado con algunos fungicidas sintéticos.

Mecanismos bioquímicos y genéticos implicados en la resistencia a los hongos. La capacidad de los fitopatógenos necrotrofos para detoxificar metabolitos secundarios puede ser un factor importante en la determinación de la especificidad del hospedero. Este mecanismo hace posible que las especies de *Alternaria* se especialicen en determinados taxa. Por ejemplo, *A. solani* es específico de tomate y papa, mientras que *A. brassicae* y *A. brassicicola* son específicos de *Brassicaceae*. En estos hongos, los ITCs pueden funcionar como un estímulo para activar los genes necesarios para la patogénesis, mientras que una especie generalista como *A. alternata*, carece de un sistema de enzimas de detoxificación contra compuestos de defensa de las *Brassicaceae* (Giamoustaris y Mithen, 1997). La tolerancia de un fitopatógeno, en particular a los compuestos tóxicos, resulta de las actividades de degradación celular que transforman a los compuestos de defensa de las plantas en sustancias menos tóxicas. Las enzimas de degradación son importantes para estos hongos, ya que eliminan el efecto de los compuestos tóxicos del hospedero, lo que permite a los hongos infectarlo. Esto fue demostrado en mutantes específicos generados por la inactivación de genes. Por ejemplo, los mutantes del fitopatógeno de la avena, *Gaeumannomyces graminis*, no son capaces de infectar a la avena debido a un defecto en la producción de avenacinasa, una enzima detoxificante de la avenacina, una saponina producida por las plantas de avena (Osborne, 1996). Otros mecanismos de tolerancia de los hongos a compuestos tóxicos se relaciona con las enzimas de la fase I y fase II,

intracelulares por oxidativa breakdown of disulfide bridges, inhibition of metabolic enzymes by thiocyanate radical and uncoupler action of oxidative phosphorylation. Apparently, the high reactivity of ITCs is due mostly to the strong electrophilic nature of the functional isothiocyanate (-NCS) group (Kroll *et al.*, 1994). Experiments *in vitro* demonstrated that allyl-isothiocyanate can form covalent bonds with the reactive sulfur group of glutathione (Kawakishi and Kaneko, 1987), as well as with the free amino and sulfhydryl group of amino acids (Cejpek *et al.*, 2000), suggesting that the ITCs can chemically react with proteins through the free amine and sulfhydryl groups present in the side groups of amino acid residues like lysine, arginine and cysteine. The antifungal activity of ITCs appear to be rather random than specific since it could react with any protein of the fungal cell. This nonspecific nature of the ITCs action site makes unlikely a mutation that could induce a resistance phenotype in fungi, as it had been observed with some synthetic fungicides.

Biochemical and genetic mechanisms involved in fungal resistance. The ability of the necrotrophic phytopathogens to detoxify secondary metabolites may be an important factor in determining host specificity. This mechanism makes possible that species of *Alternaria* become specialized on a particular taxa. For example, *A. solani* are specific on tomato and potato, whereas *A. brassicae*, and *A. brassicicola* on *Brassicaceae*. In these fungi, ITCs may function as a stimulus to switch on genes required for pathogenesis, while a more generalist species such as *A. alternata*, lacks the detoxification enzyme system against *Brassicaceae* defense compounds (Giamoustaris and Mithen, 1997). The tolerance of a particular phytopathogen to toxic compounds result of degradative cellular activities that transform the plant defense compounds into less toxic substances. The degradative enzymes are very important for these fungi since they eliminate the effect of the host toxic compound allowing the fungi to infect the particular host. This was demonstrated in specific mutants generated by gene inactivation. For instance, mutants of the oat phytopathogen *Gaeumannomyces graminis*, are unable to infect oat due to a defect in the production of avenacinase, a detoxificant enzyme of the saponine avenacine produced by oat plant (Osborne, 1996). Other mechanisms of fungi tolerance to toxic compound are related to phase I and phase II enzymes: cytochrome P450 and glutathione-S-transferases, respectively (Sellam *et al.*, 2006), or with membrane integral proteins secreting toxic compounds from the cell (Del Sorbo *et al.*, 2000). Cytochromes P450 can metabolize substances of foreign origin like drugs, toxins and environmental pollutants; glutathione-S-transferases (GST's) are highly conserved enzymes implicated in pesticide resistance, xenobiotics tolerance and response to oxidative stress in plants, insects and fungi (Burns *et al.*, 2005). These enzymes catalyze the conjugation of glutathione to electrophilic substrates, creating less reactive and more soluble compounds, and therefore facilitating their removal from the cell by glutathione conjugated pumps (Salinas and Wong, 1999). In rats, the isothiocyanates induce and modulate the

citocromo P450 y la glutatión-S-transferasa (GST), respectivamente (Sellam *et al.*, 2006), o con las proteínas integrales de membrana que secretan compuestos tóxicos de la célula (Del Sorbo *et al.*, 2000). Los citocromos P450 pueden metabolizar las sustancias exógenas, tales como fármacos, toxinas y contaminantes del medio ambiente; las GSTs son enzimas altamente conservadas implicadas en la resistencia a los plaguicidas, tolerancia hacia los xenobióticos, y la respuesta al estrés oxidativo en plantas, insectos y hongos (Burns *et al.*, 2005). Estas enzimas catalizan la conjugación de glutatión a sustratos electrofílicos, lo que da origen a compuestos menos reactivos y más solubles y, por consiguiente, facilita su eliminación de la célula (Salinas y Wong, 1999). En ratas, los ITCs inducen y modulan la actividad de las enzimas de la fase I y fase II. Existe amplia evidencia derivada de estudios en modelos animales de que determinados ITCs y sus conjugados pueden inhibir las enzimas del citocromo P450, responsables de la inducción de tumores. De esta manera, se piensa que la inducción de las GSTs funciona como medio de protección (Mithen *et al.*, 2000). Se ha encontrado evidencia de la inducción coordinada de citocromo P450 y GSTs en los hongos, por medio del tratamiento de *Streptomyces griseus* con genisteína (Dhar *et al.*, 2003). Por otra parte, la presencia de conjugados de glutatión podría dar lugar a la inducción de los transportadores ABC, los cuales pueden catalizar la eliminación de dichos conjugados de la célula. Estos transportadores tienen una función esencial en la secreción de toxinas específicas y no específicas de los hospederos, como una forma de protección contra los compuestos de defensa de la planta, así como en la resistencia a fungicidas. Existen un gran número de genes en levaduras que regulan la resistencia a xenobióticos tóxicos; sus productos son proteínas membranales de transporte pertenecientes a la superfamilia ABC (Del Sorbo *et al.*, 2000). En la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* existen por lo menos cinco transportadores ABC: Pdr5p, Snq2p, Pdr12p, Yor1p y Ycf1p (Bissinger y Kuchler, 1994).

La sobreexpresión de PDR5 causa resistencia a cientos de fármacos que no están químicamente relacionados (Kolaczowski *et al.*, 1996), incluyendo muchas clases de antimicóticos clínicos y fungicidas agrícolas, tales como anilopirimidina, bencimidazoles, ditiocarbamatos, azoles y análogos de estrobilurinas.

Por el contrario, la inactivación de PDR5 causa hipersensibilidad a los fármacos y compuestos tóxicos naturales. Además de la ABC, la superfamilia principal de transportadores facilitadores (MFS) también previenen la acumulación de compuestos tóxicos (Pao *et al.*, 1998). Anteriormente, se consideraba que los transportadores MFS se ocupaban solamente de la secreción de toxinas endógenas (Hayashi *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los transportadores MFS de *Candida albicans* y *S. cerevisiae* también están involucrados en la protección contra compuestos exógenos, tales como los inhibidores de la desmetilación de esteroides (Calabrese *et al.*, 2000). Recientemente, estudios en *Botrytis cinerea* revelaron la existencia de un transportador MFS, denominado Bcmfs1,

activities of phase I and phase II enzymes. There is broad evidence from animal models, that certain isothiocyanates and their conjugates can inhibit the cytochrome P450 enzymes responsible for tumors induction. In this way, the GSTs induction is thought to be protective (Mithen *et al.*, 2000). Evidence of coordinated induction of cytochrome P450 and GSTs in fungi was found by treating *Streptomyces griseus* with genistein (Dhar *et al.*, 2003). Moreover, the presence of glutathione conjugates could lead to the induction of ABC transporters which can catalyze the elimination of such conjugates from the cell. These transporters have an essential function in the secretion of specific and not specific host toxins, as a protection against plant defense compounds and in fungicide resistance. In yeast, there are a large number of genes regulating the resistance to toxic xenobiotics, and their products are membrane transport proteins belonging to the ABC superfamily (Del Sorbo *et al.*, 2000). In *Saccharomyces cerevisiae*, there are at least five ABC transporters on the plasma membrane: Pdr5p, Snq2p, Pdr12p, Yor1p and Ycf1p (Bissinger and Kuchler, 1994).

The overexpression of PDR5 causes resistance to hundreds of chemically not related drugs (Kolaczowski *et al.*, 1996), including many classes of clinic antimycotic and agricultural fungicides like anilopirimidine, benzimidazols, dithiocarbamates, azols and strobilurin analogues.

In contrast, the inactivation of PDR5 causes hypersensitivity to drugs and natural toxic compounds. Besides of the ABC, the major facilitator superfamily (MFS) of transporters also prevents accumulation of toxic compounds (Pao *et al.*, 1998). Formerly, it was considered that the MFS transporters were only involved in the secretion of endogenous toxins (Hayashi *et al.*, 2002). However, recent studies demonstrated that MFS transporters of *Candida albicans* and *S. cerevisiae* are also involved in protection against exogenous compounds like sterol demethylation inhibitors (Calabrese *et al.*, 2000). Recently, studies in *Botrytis cinerea* found a MFS transporter, denominated Bcmfs1, playing a role in the tolerance towards both, natural toxic compounds and synthetic fungicides. Furthermore, this MFS transporter has a substrate specificity that overlaps with the ABC transporter BcatrD of *B. cinerea*. Additionally, it was proposed that MFS transporters play a role not only as an efflux but also as influx transporters because of the increased sensitivity showed by Bcmfs1-overexpressing mutants to the presence of cycloheximide (Hayashi *et al.*, 2002). Del Sorbo *et al.* (2000), proposed that similar transporters are present virtually in all species of phytopathogenic fungi and stated that the regulation of genes encoding ABC and MFS transporters in filamentous fungi most likely will be an important topic of investigation in the future. This is because of the possibility of treatments development based in the simultaneous utilization of transcription inhibitors of such genes and fungicides on strains showing multiple resistance. In fact, there are several blockers of mammalian and yeast ABC drugs pumps including FK506, propafenones and the antifungal drug terbinafine, able to reverse the transporter-mediated azole resistance in yeast and clinical isolates of *Candida albicans* (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003).

el cual desempeña un papel en la tolerancia tanto hacia compuestos tóxicos naturales como hacia fungicidas sintéticos.

Además, este transportador MFS tiene una especificidad de sustrato que se superpone con el transportador ABC BcatrD de *B. cinerea*. Asimismo, se propuso que los transportadores MFS desempeñan una función no solo en la secreción, sino también como transportadores de afluencia, debido al aumento de la sensibilidad mostrada por la sobreexpresión de mutantes de Bcmfs1 a la presencia de cicloheximida (Hayashi *et al.*, 2002). Del Sorbo *et al.* (2000), propusieron que transportadores similares están presentes prácticamente en todas las especies de hongos fitopatógenos y afirmaron que la regulación de los genes que codifican para transportadores ABC y MFS en los hongos filamentosos, probablemente sean un importante tema de investigación en el futuro. Esto se debe a la posibilidad de desarrollo de tratamientos, basados en la utilización simultánea de inhibidores de la transcripción de dichos genes y fungicidas en las cepas que muestran resistencia múltiple. De hecho, existen varios bloqueadores de las bombas ABC de fármacos en mamíferos y levaduras, tales como FK506, propafenonas y el fármaco antifúngico terbinafina, capaz de revertir la resistencia a azoles mediada por transportadores en levaduras y en los aislados clínicos de *Candida albicans* (Schuetzner-Muehlbauer *et al.*, 2003). Recientemente, se encontró un potente inhibidor del transportador ABC Pdr5p de *S. cerevisiae*, el isonitrilo, un metabolito de un hongo del género *Trichoderma* (Yamamoto *et al.*, 2005), que incluye algunas especies importantes en el control biológico. Este compuesto causó la inhibición de la secreción de cicloheximida y cerulenina, mediada por Pdr5p, en células que sobreexpresaron Pdr5p, sin influir en la expresión del gen PDR5 o en la cantidad de proteína Pdr5. Sin embargo, la adición de isonitrilo llevó a la acumulación intracelular de rodamina 6G, un sustrato para Pdr5p.

La detoxificación de ITC por *Alternaria brassicicola*. Se llevó a cabo un experimento de hibridación sustractiva de supresión (HSS) con el objetivo de identificar los genes candidatos implicados en la patogenicidad de *A. brassicicola* en *Arabidopsis thaliana* (una planta productora de ITCs de la familia *Brassicaceae*), utilizando ARN mensajero de conidias en germinación, tanto en la superficie de hojas de *Arabidopsis* como en el agua (Cramer y Lawrence, 2004). Se encontraron cDNAs expresados diferencialmente que codifican para cianuro hidratasa, ATPasa de arsénico, formato deshidrogenasa y un homólogo del principal precursor del alérgeno Alt a1 de *A. alternata*, que fue denominado Alt b1. El hecho de que Alt b1 se expresará preferentemente en las esporas que germinaron en la superficie de la hoja de *Arabidopsis*, y no en las que germinaron en el agua, indica que la expresión Alt b1 en *A. brassicicola* está controlada por factores ambientales específicos, y que puede desempeñar un papel en la patogénesis necrotrofica fúngica de plantas (Cramer y Lawrence, 2004). Con el objetivo de investigar el mecanismo involucrado en la detoxificación de los ITCs por conidios de *A. brassicicola*, se expusieron conidias

Recientemente, it was found a potent inhibitor of the Pdr5p ABC transporter of *S. cerevisiae*, the isonitrile, a metabolite from a fungus belonging to the *Trichoderma* genus (Yamamoto *et al.*, 2005), which includes some important species in biological control. This compound inhibited the Pdr5p-mediated efflux of cycloheximide and cerulenin in Pdr5p-overexpressing cells, without influencing the PDR5 gene expression and the amount of Pdr5 protein. However, the addition of isonitrile led to the intracellular accumulation of rhodamine 6G, a substrate for Pdr5p.

Detoxification of isothiocyanates by *Alternaria brassicicola*. With the goal to identify candidate genes involved in pathogenicity of *A. brassicicola* on *Arabidopsis thaliana* (an ITC producing plant belonging to the *Brassicaceae* family), a suppressive subtractive hybridization (SSH) experiment was carried out using messenger RNA of conidia germinating either on *Arabidopsis* leaf surface or in water (Cramer and Lawrence, 2004). It was found differentially expressed cDNAs encoding cyanide hydratase, arsenic ATPase, formate dehydrogenase and a homologue of the major *A. alternata* allergen precursor Alt a1, which was denominated Alt b1. The fact that Alt b1 was preferentially expressed on spores germinating on the leaf surface of *Arabidopsis*, and not in spores germinating in water indicates that Alt b1 expression in *A. brassicicola* is controlled by specific environmental factors and may play a role in necrotrophic fungal pathogenesis of plant (Cramer and Lawrence, 2004). In order to investigate the mechanism involved in the detoxification of ITCs by *A. brassicicola*, germinated conidia of this fungus was exposed to 2p-ITC and BITC performing a differential expression protocol. The result was the isolation of the *AbGst1* gene, encoding a GST denominated AbGst1p (Sellam *et al.*, 2006). The expression of AbGst1p in *E. coli* showed high glutathione transferase activity with 2p-ITC and benzyl-ITC as substrates. Additionally, the *AbGst1* upregulation was found during the beginning of the conidial germination, *A. thaliana* leaf tissues penetration and the larger amount of fungal DNA; indicating that *A. brassicicola* germinating conidia were attempting to initiate the infection of the plant. Apparently, the isothiocyanate detoxification mechanism involving GSTs is remarkably conserved in fungi. Another experiment with suppressive subtractive hybridization (SSH) was carried out to generate a cDNA library from germinated conidia of *A. brassicicola* treated with 2p-ITC (Sellam *et al.*, 2007). The fungus response was an oxidative stress like, in such a way that 35% of genes transcriptionally induced by 2p-ITC are involved in the oxidative stress response: GSTs, glutathione peroxidases, glutamylcysteine synthetases, thioredoxins, thioredoxin reductases, oxidoreductases and cytochrome P450. The response included also mechanisms playing a role in reducing the intracellular accumulation of the compound: 16% of cDNAs induced by ITC treatment encode transporter proteins, mostly PDR type ABC and MFS. These results suggested that a redox imbalance occurs following the exposure to 2p-ITC, as a result of the depletion of the antioxidant GSH due to the reaction with ITCs. This leads to the activation of the conserved ITC detoxification

germinados de este hongo a 2-propenil isotiocianato (2p-ITC) y bencil isotiocianato (BITC), realizando un protocolo de expresión diferencial. El resultado fue el aislamiento del gen *AbGst1p*, que codifica para una GST denominada *AbGst1p* (Sellam *et al.*, 2006). La expresión de *AbGst1p* en *E. coli* reveló una alta actividad de glutatión transferasa con 2p-ITC y BITC como sustratos. Además, se encontró la regulación positiva de *AbGst1* durante el inicio de la germinación de conidios, la penetración de tejidos de la hoja de *A. thaliana* y la mayor cantidad de ADN del hongo, lo que indica que la germinación de conidios de *A. brassicicola* era parte del mecanismo para llevar a cabo la infección de la planta. Al parecer, el mecanismo de detoxificación del ITC, en el que participa la GST, es altamente conservado en los hongos. Otro experimento con HSS se llevó a cabo para generar una biblioteca de cDNA de conidias germinadas de *A. brassicicola* tratadas con 2p-ITC (Sellam *et al.*, 2007). La respuesta del hongo fue similar a la respuesta por estrés oxidativo, de tal manera que el 35% de los genes transcripcionalmente inducidos por 2p-ITC están involucrados en la respuesta al estrés oxidativo: GST, glutatión peroxidasa, glutamylcisteína sintetasa, tioredoxinas, tioredoxin reductasas, oxidorreductasas y citocromo P450. La respuesta incluye también mecanismos que desempeñan un papel en la reducción de la acumulación intracelular del compuesto: 16% de los cDNAs inducidos por tratamientos con ITC, codifican para transportadores de proteínas, sobre todo del tipo PDR, ABC y MFS. Estos resultados sugieren que se produce un desequilibrio redox tras la exposición a 2p-ITC como resultado del agotamiento del GSH antioxidante, debido a la reacción con los ITCs. Esto conduce a la activación del mecanismo conservado de detoxificación de ITC mediado por las enzimas de la fase I y fase II. En un estudio más reciente, se expuso a *A. alternata* al 2p-ITC, con el objetivo de aislar los genes inducidos mediante protocolo de hibridación sustractiva (Báez-Flores *et al.*, 2011). En este estudio se encontró la probable participación de calcio en la respuesta fúgica. Por otra parte, se encontró la activación de un transportador ABC, que confirma lo reportado en trabajos previos, en los que se encontró la expresión de un transportador ABC en *A. brassicicola* tratada con 2p-ITC (Sellam *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

En base a la evidencia revisada, los ITCs inducen el estrés oxidativo, lo que explica la inducción de proteínas tales como la glutatión peroxidasa, glutamylcisteína sintetasa, tioredoxinas, tioredoxina reductasas, oxidorreductasas y del citocromo P450. Además, el mecanismo de defensa de *Alternaria* contra los efectos tóxicos de los ITCs incluye la inducción de las proteínas para eliminar el ITCs de la célula; por ejemplo, ITC's y transportadores ABC. El conocimiento científico analizado en esta revisión sugiere que la combinación de los ITCs con inhibidores de las proteínas que desempeña una función relevante en la detoxificación de los hongos, tales como el transportador ABC, podría ser un tratamiento más eficaz para el control de hongos. Es probable que este protocolo reduzca las pérdidas en frutas y hortalizas

mechanism mediated by phase I and phase II enzymes. In a more recent study, *A. alternata* was exposed to the 2p-ITC with the goal to isolate the genes induced by using a subtractive hybridization protocol (Báez-Flores *et al.*, 2011). In this study, it was found the putative involvement of calcium in the fungal response. Moreover, it was found the activation of an ABC transporter which agrees with previous work in which the expression of an ABC transporter was found in *A. brassicicola* treated with 2p-ITC (Sellam *et al.*, 2007).

CONCLUSIONS

Based on the evidence reviewed, it appears that the ITCs induce oxidative stress, which explains the induction of proteins like glutathione peroxidases, glutamylcysteine synthetases, thioredoxins, thioredoxins reductases, oxidoreductases and cytochrome P450. Also, *Alternaria* defense mechanism against the ITCs toxic effects includes the induction of proteins to remove the ITC from the cell *e.g.* glutathione-S-transferases and ABC transporters. Scientific knowledge analyzed in this review suggests that the combination of the ITCs with inhibitors of the proteins playing a role in fungi detoxification, like the ABC transporter, could be a more effective treatment for fungi control. It is probable that this protocol will reduce the fruit and vegetable losses due to the fungi infections during postharvest without negative effects on human health and the environment.

LITERATURE CITED

- Báez-Flores, M.E., Troncoso-Rojas, R., Islas-Osuna, M.A., Rivera-Domínguez, M. and Tiznado-Hernández, M.E. 2011. Differentially expressed cDNAs in *Alternaria alternata* treated with 2-propenyl isothiocyanate. *Microbiological Research* doi:10.1016/j.micres.2010.11.004.
- Barbosa-Cánovas, G., Fernández-Molina, J.J., Alzamora, S.M., Tapia, M.S., López-Malo, A. and Welti Chanes, J. 2003. Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas: Technical Manual. Roma, Italia. 6p.
- Bissinger, P.H. and Kuchler, K. 1994. Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *stsl* gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *Journal of Biological Chemistry* 269:4180-4186.
- Brown, P.D. and Morra, M.J. 1995. Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:3070-3074.
- Burns, C., Geraghty, R., Neville, C., Murphy, A., Kavanagh, K. and Doyle, S. 2005. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology* 42:319-327.
- Calabrese, D., Bille, J. and Sanglard, D. 2000. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*flu1*) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* 146:2743-2754.
- Cejpek, K., Valusek, J. and Velíšek, J. 2000. Reactions of allyl

debido a las infecciones por hongos durante el período post-cosecha, sin efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente.

- isothiocyanate with alanine, glycine, and several peptides in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3560-3565.
- Cramer, R.A. and Lawrence, C.B. 2004. Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed in plant during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Genetics and Biology* 41:115-128.
- Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. and De Waard, M. 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 30:1-15.
- Dhar, K., Dhar, A. and Rosazza, J. 2003. Glutathione-S-transferase isoenzymes from *Streptomyces griseus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:707-710.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Giamoustaris, A. and Mithen, R. 1997. Glucosinolates and disease resistance in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Plant Pathology* 46:271-275.
- Hayashi, K., Schoonbeek, H. and De Waard, M.A. 2002. Bcmfs 1, a novel major facilitator superfamily transporter from *Botrytis cinerea*, provides tolerance towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4996-5004.
- Jarne, P. and Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11:424-429.
- Kawakishi, S. and Kaneko, T. 1987. Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35:85-88.
- Kermanshai, R., McCarry, B.E., Rosenfeld, J., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A. and Sorger, G.J. 2001. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry* 57:427-435.
- Kolaczowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczowska, A., Soumillion, J.P., Konings, W.N. and Goffeau, A. 1996. Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter pdr5p. *Journal of Biological Chemistry* 271:31543-31548.
- Kroll, J., Noack, J., Rawel, H., Kroeck, R. and Proll, J. 1994. Chemical reactions of benzyl isothiocyanate with egg-white protein fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65:337-345.
- Manici, L., Lazzeri, L. and Palmieri, S. 1997. *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:2768-2773.
- Mayton, H., Olivier, C., Vaughn, S. and Loria, R. 1996. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology* 86:267-271.
- Mithen, R.F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S. and Johnson, I.T. 2000. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:967-984.
- Osborn, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8:1821-1831.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. and Saier, Jr. M.H. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1-34.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Olds, T. and Kroymann, J. 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11223-11228.
- Salinas, A.E. and Wong, M.G. 1999. Glutathione-S-transferases - a review. *Current Medicinal Chemistry* 6:279-309.
- Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Egner, R., Ecker, G. and Kuchler, K. 2003. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22:291-300.
- Sellam, A., Dongo, A., Guillemette, T., Hudhomme, P. and Simoneau, P. 2007. Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant Pathology* 8:195-208.
- Sellam, A., Poupard, P. and Simoneau, P. 2006. Molecular cloning of *AbGst1* encoding a glutathione transferase differentially expressed during exposure of *Alternaria brassicicola* to isothiocyanates. *FEMS Microbiology Letters* 258:241-249.
- Sharma, R.R., Singh, D. and Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50:205-221.
- Sigareva, M.A. and Earle, E.D. 1999. Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* 98:164-170.
- Tajima, H., Kimoto, H., Taketo, Y. and Taketo, A. 1998. Effects of synthetic hydroxy isothiocyanates on microbial systems. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62:491-495.
- Tiznado-Hernández, M.E. and Troncoso-Rojas, R. 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates. *Stewart Postharvest Review* 2:1-14.
- Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., Ruelas, C., García, H.S. and Tiznado-Hernández, M. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1427-1434.
- Troncoso-Rojas, R. and Tiznado-Hernández, M.E. 2007. Natural compounds to control fungal diseases in fruits & vegetables. Pp:27-156. *In: Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M.E. and González-León, A. (eds). Recent Advances in Alternative Postharvest Technologies to Control Fungal Diseases in Fruits & Vegetables.*

- Kerala, India: Transworld Research Network.
- Troncoso, R., Espinoza, C., Sánchez-Estrada, A., Tiznado, M.E. and García, H.S. 2005. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Research International* 38:701-708.
- Vig, A.P., Rampal, G., Thind, T.S. and Arora, S. 2009. Bio-protective effects of glucosinolatos -A review. *LWT-Food Science and Technology* 42:1561-1572.
- Wistock, U. and Halkier, B.A. 2002. A glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science* 7:263-270.
- Yamamoto, S., Hiraga, K., Abiko, A., Hamanaka, N. and Oda, K. 2005. A new function of isonitrile as an inhibitor of the Pdr5p multidrug ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330:622-628.