

Histopatología de la interacción compatible e incompatible entre *Puccinia melanocephala* y caña de azúcar var. B4362

María I. Oloriz¹*, Luis Rojas¹, Víctor Gil², Orelvis Portal¹, Elio Jiménez¹ * Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

² Centro de Investigaciones Agropecuarias Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: maria@ibp.co.cu

RESUMEN

La inducción de mutaciones representa una alternativa para el mejoramiento genético de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) y se ha utilizado para la obtención de mutantes con resistencia a la roya (*Puccinia melanocephala*). En un mutante (IBP 8518) de la variedad B4362, con resistencia a esta enfermedad, mediante estudios histopatológicos se determinaron las características del proceso de infección del patógeno. Se inocularon fragmentos de hojas con *P. melanocephala* y se tiñeron con lactofenol- azul tripan para observar en el microscopio óptico la autofluorescencia de las células como respuesta hipersensible. Se demostró que la resistencia del mutante involucra una respuesta hipersensible en el sitio de interacción con el hongo y no depende de posibles cambios estructurales de la superficie foliar. La caracterización histológica de esta interacción incompatible puede contribuir al estudio molecular de los procesos de resistencia a *P. melanocephala* en caña de azúcar.

Palabras clave: histología, respuesta hipersensible, mutante

ABSTRACT

Induction of mutations is an alternative for genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). It has been used to obtain mutants with resistance to rust (*Puccinia melanocephala*). Characteristics of pathogen infection process were identified through histopathological studies in a mutant (IBP 8518) of the B4362 variety, with resistance to this disease. Fragments of leaves were inoculated with *P. melanocephala*. Then, these were stained with lactophenol tripan blue to observe, in the optical microscope, the autofluorescence of the dead cell as hypersensitive response. The essay demonstrated first that resistance of mutant involves a hypersensitive response at the place of interaction with the fungus. The it does not depend on possible structural changes of the leaf surface. Histological characterization of this incompatible interaction could contribute to the study of molecular processes of resistance to *P. melanocephala* in sugarcane.

Keywords: histology, hypersensitive response, mutant

INTRODUCCIÓN

Las plantas constantemente están sometidas a estrés biótico. La respuesta defensiva de estas ocurre a varios niveles logrando que por regla general el estado patológico, es decir la enfermedad sea una excepción.

Para que un hongo como *Puccinia melanocephala* logre tener éxito durante la colonización de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) debe transitar diferentes etapas de su ciclo de vida que inician con la germinación de la uredospora sobre la superficie de la hoja, elongación del tubo germinativo, diferenciación del apresorio, penetración estomática y posteriormente el acceso al interior celular. Cada una de estas etapas puede ser alterada por barreras físicas o químicas de la planta que obstaculicen el desarrollo de la enfermedad.

Todavía existe un insuficiente conocimiento de las bases moleculares que rigen la respuesta de

resistencia a *P. melanocephala* en caña de azúcar. El empleo de mutantes con resistencia alterada a la enfermedad puede facilitar los estudios de estos mecanismos de defensa. El objetivo de este trabajo fue estudiar por microscopía las posibles barreras con que cuenta un mutante de caña de azúcar var. B4362 resistente a la roya para superar la infección por *P. melanocephala*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se sembraron estacas de una yema del tercio central del tallo de los genotipos B4362 y su mutante resistente IBP 8518. Se emplearon bolsas de polietileno de 800 cm³ con una mezcla de compost y suelo pardo sialítico en una proporción 1:1 v/v y como fertilizante 0.2 g de NPK (12:15:20) por bolsa.

Las plantas de dos meses de cultivo fueron inoculadas con una suspensión de esporas de 4-5x10⁵ uredosporas. ml⁻¹ en casas de cultivo con

condiciones controladas de alta humedad relativa, luz solar y temperaturas entre 25 y 30 °C.

Se colectaron fragmentos de las hojas +1 y +2 durante 13 días posteriores a la infección. La muerte celular fue visualizada por tinción con lactofenol-azul tripan como describen Waspi *et al.* (2001). La autofluorescencia fue observada por microscopía epifluorescente (excitación a 460 nm y emisión a 478 nm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tinción con lactofenol y azul tripan permitió teñir las estructuras del hongo y aclarar el tejido foliar de caña de azúcar sin perder la autofluorescencia de las células que desarrollan la respuesta hipersensible.

Los estudios de la interacción de *P. melanocephala* con el mutante resistente a la roya IBP 8518 demostraron que las uredosporas son capaces de germinar y orientar su tubo germinativo perpendicularmente al eje de las axilas de las células epidérmicas. Este crecimiento ocurrió hasta reconocer la topografía del estoma donde desarrolló un apresorio y penetró al interior de la planta.

Este proceso es similar al desarrollo de *P. melanocephala* observado en la superficie de las hojas de la variedad susceptible B4362 y coincide con las descripciones realizadas en otros genotipos de caña de azúcar resistentes (Sotomayor *et al.*, 1983) y para otras especies de la familia *Pucciniaceae* como *P. graminis* en el proceso de infección del trigo (*Triticum aestivum*) (Leonard *et al.*, 2005).

Durante las etapas previas a la penetración estomática del hongo no se observaron cambios en las células epidérmicas del mutante IBP 8518 por lo que se infiere que la resistencia depende de etapas posteriores a la penetración estomática del hongo y no de posibles cambios estructurales de la superficie foliar como la topografía del estoma o a la sensibilización de las células epidérmicas por un posible exudado de las uredosporas.

La respuesta hipersensible del genotipo IBP 8518 fue observada en las células alrededor del sitio de penetración del hongo. Las Figuras 1 y 2 muestran una etapa tardía de la interacción, en los que se observa un crecimiento limitado del haustorium por la muerte de la célula hospedero lo que impide el desarrollo de estructuras del hongo. Similares resultados encontró Sotomayor *et al.* (1983) en la interacción incompatible *P. melanocephala*-caña de azúcar y Martínez *et al.* (2004) durante el desarrollo de *P. hordei* en genotipos resistentes de cebada (*Hordeum vulgare* L.).

En igualdad de condiciones experimentales, en la interacción compatible con B4362, *P. melanocephala* completó exitosamente el ciclo de vida con producción de pústulas esporulantes entre los días 11 y 13 posteriores a la inoculación (dpi).

La respuesta hipersensible observada en el mutante IBP 8518, que limitó el desarrollo de *P. melanocephala* en el interior celular, abre la posibilidad del empleo de este mutante en los estudios moleculares comparativos de la interacción *P. melanocephala*-caña de azúcar.

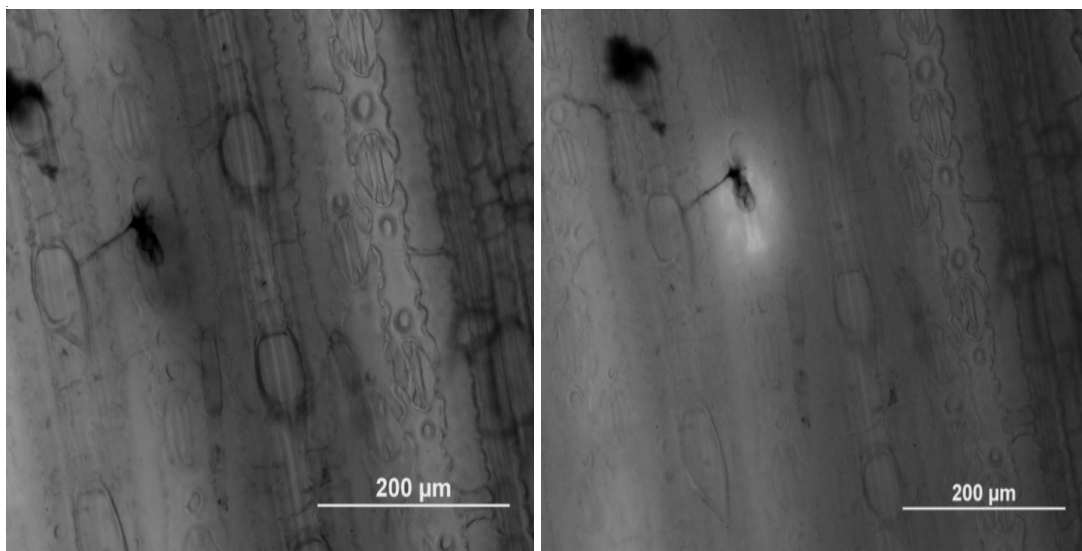


Figura 1. Apresorio de *P. melanocephala* y autofluorescencia de las células del mutante resistente en contacto con el hongo, 8 días posteriores a la inoculación. Luz blanca (izquierda) y luz ultravioleta (derecha).

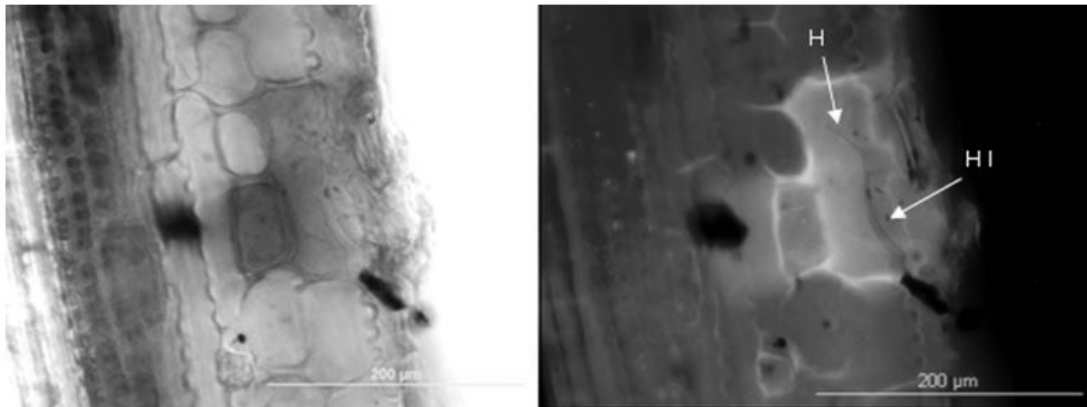


Figure 2. Respuesta hipersensible en el sitio de interacción de *P. melanocephala* con el mutante resistente a la roya IBP8518 (13 dpi). Luz blanca (izquierda) y luz ultravioleta (derecha). Las flechas indican la hifa de infección (HI) y el haustorium (H) de *P. melanocephala*

REFERENCIAS

Leonard, KJ, Szabo, LJ (2005) Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology* 6 (2): 99-111

Martínez, F, Sillero, J C, Rubiales, D (2004) Effect of host plant resistance on haustorium formation in cereal rust fungi .*J. Phytopathology* 152: 381–382

Sotomayor, IA, Purdy LH, Trese AT (1983) Infection of sugarcane leaves by *Puccinia melanocephala*. *Phytopathology* 73: 695-699

Wäspi, U, Schweizer, P, Dudler, R (2001) Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew .*The Plant Cell* 13: 153–161