

## Caracterización histológica de la respuesta de caña de azúcar a la infección por *Puccinia kuehnii*

María Ileana Oloriz Ortega<sup>1</sup>, Borys Luis Valdés<sup>1,2</sup>, Osmany Aday<sup>2</sup>, Bárbara Ocaña<sup>1</sup>, Marilin Hernández<sup>1</sup>, Víctor Gil<sup>3</sup>, Annia González<sup>4</sup>, Leonardo Rivero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Carretera al CAI Martínez Prieto km 1½. Boyeros. La Habana. Cuba. CP 19 390.

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> Centro de Información y Gestión Tecnológica. Buen viaje 18 e/ Maceo y Parque. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

\*Autora para correspondencia e-mail: maria@ibp.co.cu

### RESUMEN

La roya naranja de la caña de azúcar, causada por (*Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler, es una de las principales enfermedades que afectan la producción de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) a nivel mundial. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar por histología el desarrollo de *P. kuehnii* en hojas y la respuesta de los cultivares a la enfermedad. Se seleccionaron cuatro cultivares con diferentes grados de respuesta a la infección, los que fueron inoculados en casa de cultivo. Se realizaron estudios por microscopía en fragmentos de hojas de plantas a los 5 y 15 días posteriores a la inoculación. Se demostró que el desarrollo de las estructuras del hongo previas la penetración del tejido foliar son similares en todos los cultivares, con independencia del tipo de respuesta de la planta. Se encontró que el cultivar con grado 1 presenta una respuesta similar a la respuesta hipersensible, mientras que el grado 2 hace suponer una resistencia a partir de la contribución cuantitativa de varios genes. Los resultados son un aporte al entendimiento de las bases genéticas de la resistencia de la caña de azúcar a la roya naranja.

Palabras clave: mejora genética, resistencia, roya naranja

### Histological characterization of the sugarcane response to *Puccinia kuehnii* infection

#### ABSTRACT

Sugarcane orange rust, caused by *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler, is one of the major diseases impacting sugarcane *Saccharum* spp. production worldwide. The objective of this work was to characterize by histology the development of *P. kuehnii* in leaves and the response of the cultivars to the disease. Four cultivars with different degrees of infection response were inoculated in greenhouse. Microscopy studies were performed in leaf fragments of plants at 5 and 15 days after inoculation. It was shown that the development of fungus structures, prior to foliar tissue penetration, are similar in all cultivars regardless of the type of plant response. It was found that cultivar with grade 1 developed response similar to the hypersensitive response, while grade 2 suggests resistance based on the quantitative contribution of several genes. The results are a contribution towards understanding the genetic basis of orange rust resistance in sugarcane.

Keywords: genetic improvement, orange rust, resistance

## INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es cultivada en varias regiones del mundo y ocupa aproximadamente 27.1 millones de hectáreas. De ella se extraen alrededor del 80% del azúcar que se consume a nivel mundial y el 60% del bioetanol (Dahlquist, 2013; FAO, 2014). El cultivo está afectado por factores bióticos y abióticos que reducen su productividad (Chandiposha, 2013).

La roya naranja causada por *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) EJ Butler cobró importancia económica a partir de la epifitía ocurrida en Australia en el año 2000 en el cultivar Q124. Su extensión al hemisferio Occidental fue informada en Florida en el 2007 y seguidamente en Cuba en el 2008, Guatemala, México, El Salvador, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Brazil y Colombia. La enfermedad puede causar pérdidas de hasta el 40% de los rendimientos en cultivares susceptibles (CABI, 2019).

Debido a la reciente importancia que ha cobrado la roya naranja (Zhao *et al.*, 2015), el escaso conocimiento de las bases genéticas de la resistencia y la poca exploración genética del germoplasma con que se cuenta en la actualidad, se convierte en un reto para los mejoradores genéticos la búsqueda de cultivares resistentes a la enfermedad.

Valdés *et al.* (2016) realizaron la identificación morfológica y molecular de *P. kuehnii* en plantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en la provincia de Villa Clara, Cuba, la que emplearon para evaluar en casa de cultivo la respuesta de 16 cultivares frente a la roya naranja. A partir de estos resultados, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar por histología el desarrollo de *P. kuehnii* en hojas y la respuesta de los cultivares a la enfermedad en casa de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para la caracterización histológica de la respuesta de los cultivares a la infección por *P. kuehnii*, se seleccionaron cuatro cultivares de caña de azúcar por su

respuesta a la infección, en casa de cultivo, descrita previamente por Valdés *et al.* (2016). Cultivar IBP 8518 (grado 1, resistente), cultivar C90-469 (grado 2, moderadamente resistente), cultivares CP72-2086, Q124 (grado 4, susceptible), según la escala de Sood *et al.* (2013).

Se plantaron estacas de una yema en bolsas con capacidad de 1000 g con una mezcla de compost y zeolita como sustrato en una proporción 80:20. El manejo agronómico de las plantas se realizó según las Normas y Procedimientos del Programa de Fitomejoramiento de la Caña de Azúcar en Cuba (Jorge *et al.*, 2011), bajo condiciones de casa de cultivo del IBP.

A los 60 días posteriores a la plantación, se seleccionaron 10 plantas por cultivar y se inocularon con una suspensión de esporas de  $4-5 \times 10^5$  uredosporas  $\text{ml}^{-1}$  en agua destilada estéril. La metodología empleada fue la descrita por Valdés *et al.* (2017).

Se cortaron fragmentos de hojas +1 y +2 con lesiones, a los 5 y 15 días posteriores a la inoculación. Se colocaron en tubos Eppendorf con 1.3 ml de la solución de tinción lactofenol-azul tripán-etanol (10 ml, 0.05 g, 10 ml), según Waspi *et al.* (2001). Los tubos se colocaron en agua a punto de ebullición durante 3 min y luego se mantuvieron en reposo durante una hora.

La decoloración del tejido se realizó con hidrato de cloral (20 g, 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 25 ml de etanol absoluto). Los fragmentos de tejido se observaron bajo el microscopio óptico Novel, acoplado a una cámara digital (HDCE-50B), en la que se visualizaron las estructuras del hongo, la muerte celular del tejido vegetal, la coloración naranja del tejido por acumulación de compuestos fenólicos y la formación del urideno en cultivares susceptibles.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las observaciones realizadas al microscopio óptico revelaron que las uredosporas de *P. kuehnii* germinaron sobre la epidermis por el envés de las hojas de los diferentes cultivares de caña de azúcar estudiados, con independencia del tipo de respuesta a la infección. Dichas uredosporas

desarrollaron un tubo germinativo que creció con orientación perpendicular al eje longitudinal de la hoja (Figura 1 a). Este proceso de crecimiento continuó hasta que se produjo un reconocimiento de la topografía del estoma, un engrosamiento del tubo germinativo sobre su superficie, diferenciación del apresorio y la penetración al interior de la hoja (Figura 2, Figura 3, Figura 4).

Estos resultados concuerdan con la descripción de las estructuras de *P. kuehni* realizada por Pérez *et al.* (2013), y las de otras especies del género, como *Puccinia melanocephala* H. & Syd en caña de azúcar

(Sotomayor *et al.*, 1983; Oloriz *et al.*, 2008) y *Puccinia graminis* f. sp. tritici en el proceso de infección de *Triticum aestivum* L. (Leonard *et al.*, 2005).

A través de los estudios histológicos se identificaron, además, diferencias en la respuesta de los cultivares a la infección por *P. kuehni*. El cultivar IBP8518 (grado 1, resistente), mostró acumulación de compuestos fenólicos con coloración naranja oscuro-marrón (código hex: # 8A4308) en pocas células próximas al sitio de penetración del hongo sin posterior desarrollo del urinedio, similar a una respuesta hipersensible (Figura 2).

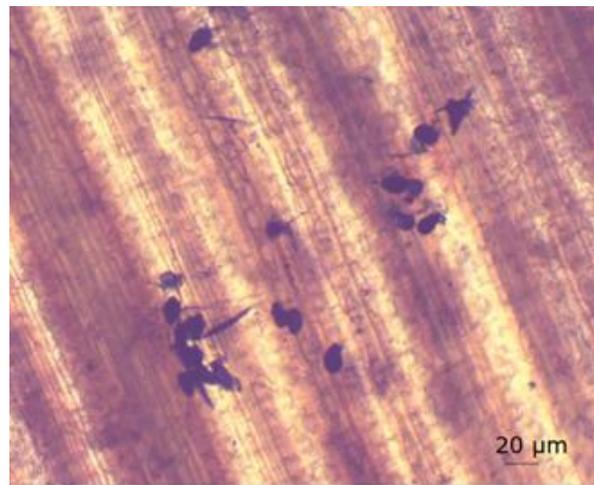


Figura 1. Uredosporas de *Puccinia kuehni* con desarrollo del tubo germinativo sobre la epidermis de la hoja de caña de azúcar (5 dpi). 100x.

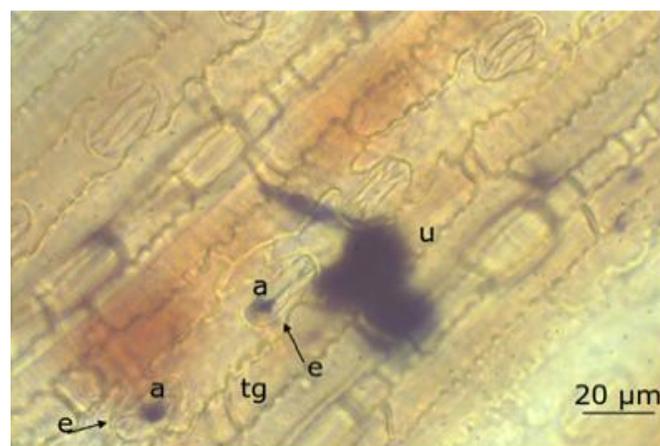


Figura 2. Tejido foliar de caña de azúcar cultivar IBP8518 con acumulación de compuestos fenólicos, en un escaso número de células, como respuesta a la infección por *Puccinia kuehni* a los 15 dpi. Uredospora (u), tubo germinativo (tg), apresorio (a) estoma (e). 400x.

Por otra parte, el cultivar C90-469 (grado 2, moderadamente resistente), mostró acumulación de compuestos fenólicos en el sitio de penetración, coloración naranja (código hex: # FE9A2E), menos intenso que el cultivar IBP8518 e involucraron un mayor número de células (Figura 3).

En el caso de los cultivares susceptibles se observó el desarrollo de las estructuras del hongo que comprometió las células infestadas de la planta en el establecimiento del futuro uridonio (Figuras 4 y Figura 5). En la respuesta de estos cultivares a la infección con *P. kuehni* se apreció tejido necrosado teñido de azul, que lo diferenció de los grados 1 y 2 de resistencia, en los que se mantuvo la

integridad del tejido y se produjo solamente la acumulación de compuestos fenólicos en la zona próxima al sitio de la penetración.

Las observaciones realizadas al microscopio óptico, permitieron demostrar que para los cultivares estudiados con diferentes grados de resistencia a *P. kuehni*, la germinación de la uredospora, el crecimiento del tubo germinativo sobre la epidermis de la hoja y la penetración del hongo por los estomas ocurre de modo similar. Esto evidenció que las respuestas diferenciales encontradas entre cultivares son consecuencia de las interacciones entre *P. kuehni* y caña de azúcar, posteriores a la penetración del hongo en el tejido foliar.



Figura 3. Infección de *Puccinia kuehni* sobre hoja de caña de azúcar cultivar C90-469 (grado 2, moderadamente resistente) y con tejido próximo al sitio de infección con acumulación de compuestos fenólicos a los 15 dpi. Uredospora (u) con desarrollo del tubo germinativo (tg), estoma (e), apresorio (a). 400x.

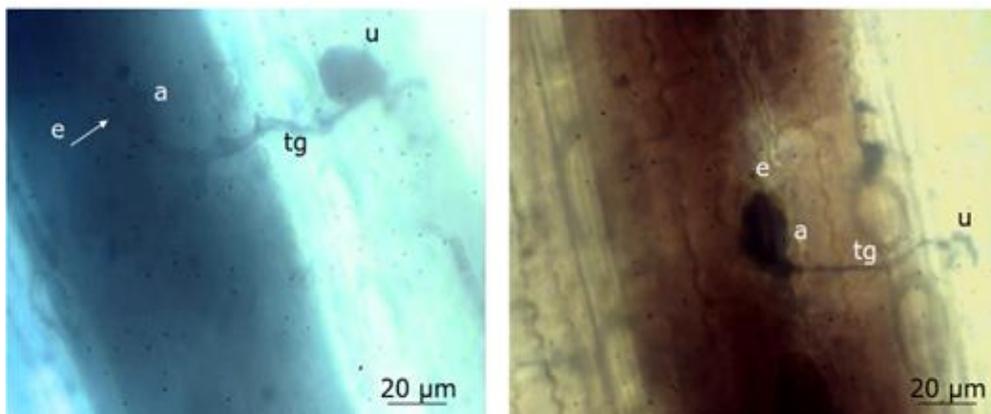


Figura 4. Respuesta de caña de azúcar cultivar CP72-2086 (susceptible) a la infección por *Puccinia kuehni* a los 15 dpi. Tejido foliar necrosado junto a las estructuras del hongo. u) uredospora, tg) tubo germinativo a) apresorio e) estoma. 400x.

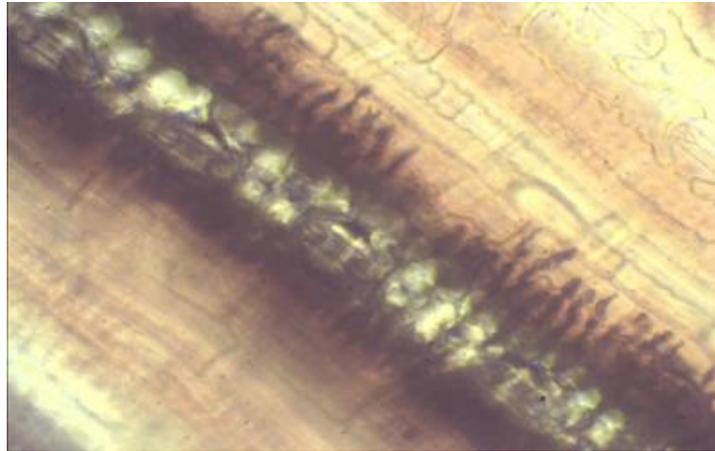


Figura. 5 Uridenio de *Puccinia kuehnii* sobre tejido foliar de caña de azúcar cultivar Q124 infectado. 15 dpi. 400x.

Los estudios histopatológicos complementaron la caracterización realizada a partir del fenotipo de la respuesta de cada cultivar (Valdés *et al.*, 2016). En este estudio se corroboró la presencia de una respuesta similar a la hipersensible en el cultivar IBP8518 con grado 1 de resistencia a la roya naranja, que hace suponer la existencia de un gen de resistencia (R) que reconoce un gen de avirulencia (avr) de *P. kuehnii* durante la interacción. Similares resultados fueron observados en este cultivar durante la interacción con la roya parda causada por *P. melanocephala* (Oloriz *et al.*, 2012a), esto lo convierte en un material de gran valor genético para los programas de mejoramiento, al brindar una fuente de resistencia a dos hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, derivada de un evento de inducción de mutaciones (Oloriz *et al.*, 2012b).

Para el cultivar con grado 2 (C90-469), moderadamente resistente, resulta más difícil diferenciar si se trata de una respuesta hipersensible o no. En este caso deben realizarse estudios histoquímicos que permitan comprobar la producción de especies reactivas de oxígeno en el sitio de penetración del hongo, entre otros. No obstante, la observación de un área más extensa de coloración naranja en estos cultivares, podría entenderse como el resultado de la contribución cuantitativa de varios genes a la resistencia. En este sentido, Yang *et al.* (2018) encontraron tres QTLs (del inglés: *Quantitative Trait Loci*) que controlan la resistencia a la roya naranja en caña de

azúcar (qORR109, qORR4 y qORR102), los cuales pueden explicar por separado el 58, 12 y 8% de las variaciones en el fenotipo en la población en estudio.

Estos resultados son un complemento a los estudios de caracterización de cultivares frente a la infección por *P. kuehnii*, al brindarse detalles de la respuesta de defensa de la planta, que contribuyen al conocimiento sobre los posibles mecanismos de resistencia a la roya naranja en el cultivo. Pueden ser aplicados a otros cultivares de interés y en futuros estudios de interacción caña de azúcar-*P. kuehnii*.

#### CONCLUSIONES

El desarrollo de *P. kuehnii* en hojas de caña de azúcar se caracteriza por la germinación de las uredosporas, el crecimiento del tubo germinativo sobre la epidermis de la hoja y la penetración del hongo por los estomas, independientemente de la respuesta del cultivar. Además, las respuestas diferenciales entre cultivares se manifiestan después de la penetración del hongo, mediante la acumulación de compuestos fenólicos en las células y el desarrollo o no del urinedio.

Conflicto de interés

No se declaran conflictos de intereses.

#### REFERENCIAS

CABI (2019) Invasive Species Compendium. Disponible en: <https://www.cabi.org>. Consultado 28/Agosto/2019

- Chandiposha M (2013) Potential impact of climate change in sugarcane and mitigation strategies in Zimbabwe. *African Journal of Agricultural Research* 8: 2814-2818
- Dahlquist E (2013) *Biomass as Energy Source: Resources, Systems and Applications*. CRC Press, London
- FAO (2014) FAOSTAT, FAO Statistical Databases. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/>. Consultado 07/Junio/2016
- Jorge H, Jorge I, Mesa JM, Bernal N (2011) Normas y procedimientos del programa de mejoramiento genético de la caña de azúcar en Cuba. PUBLINICA, La Habana
- Leonard, KJ, Szabo LJ (2005) Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology* 6 (2): 99-111; doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00273.x
- Oloriz MI, Gil V, Rojas L, Portal O, Jiménez E (2008) Histopatología de la interacción compatible e incompatible entre *Puccinia melanocephala* y caña de azúcar var. B4362. *Biotecnología Vegetal* 8(1): 123-125
- Oloriz MI, Gil V, Rojas L, Portal O, Izquierdo Y, Jiménez E, Höfte M (2012a) Sugarcane genes differentially expressed in response to *Puccinia melanocephala* infection: identification and transcript profiling. *Plant Cell Reports* 31: 955-969; doi: 10.1007/s00299-011-1216-6
- Oloriz MI, Gil V, Rojas L, Veitía N, Höfte M, Jiménez E (2012b) Selection and characterisation of sugarcane mutants with improved resistance to brown rust obtained by induced mutation. *Crop and Pasture Science* 62(12): 1037-1044; doi: 10.1071/CP11180
- Pérez HI, Santana IA, Rodríguez ID, Acevedo RR (2013) Caña de azúcar y sostenibilidad Manejo sostenible de tierras en la producción de caña de azúcar. En: Muñoz AM (Ed). *Manejo sostenible de tierras en la producción de caña de azúcar*, pp. 21-28. AZCUBA-INICA, La Habana
- Sood S, Comstock JC, Raid RN (2013) Evaluation of sugarcane clones in the CP-cultivar program for resistance to *Puccinia kuehni*, the pathogen of orange rust. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol* 28: 1-7
- Sotomayor IA, Purdy LH, Trese AT (1983) Infection of sugarcane leaves by *Puccinia melanocephala*. *Phytopathology* 73: 695-699
- Valdés BL, Aday O, Ocaña B, Rojas LE, Hernández M, Acosta-Suárez M, Gil V, González A, Rivero L, Oloriz MI (2016) Caracterización de la respuesta de cultivares a la roya naranja en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal* 16: 21-29
- Valdés BL, Aday O, Ocaña B, Rojas LE, Hernández M, Acosta-Suárez M, Gil V, González A, Rivero L, Oloriz MI (2017) Protocolo para seleccionar cultivares de caña de azúcar resistentes a la roya naranja mediante inoculación artificial en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal* 17: 3-9
- Zhao D, Davidson RW, Baltazar M, Comstock JC (2015) Field evaluation of sugarcane orange rust for first clonal stage of the CP cultivar development program. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 10: 1-11; doi: 10.3844/ajabssp.2015.1.11
- Waspi 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
- Yang X, Islam MS, Sood S, Maya S, Hanson EA, Comstock J and Wang J (2018) Identifying Quantitative Trait Loci (QTLs) and Developing Diagnostic Markers Linked to Orange Rust Resistance in Sugarcane (*Saccharum* spp.). *Front Plant Sci* 9: 350; doi: 10.3389/fpls.2018.00350

Recibido: 30-08-2019

Aceptado: 01-10-2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y autores.