

## ANÁLISIS Y COMENTARIOS

# TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN CAÑA DE AZÚCAR- *Sporisorium scitamineum*<sup>1</sup>

María La O-Hechavarría<sup>2</sup>, María de los Ángeles Zardón-Navarro<sup>2</sup>, Ariel Arencibia-Rodríguez<sup>2</sup>,  
Eida Rodríguez-Lema<sup>2</sup>, Ricardo Acevedo-Rojas<sup>2</sup>, José María Mesa-López<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Técnicas para el estudio de la interacción caña de azúcar - *Sporisorium scitamineum*.** El objetivo del presente trabajo fue revisar las herramientas y técnicas de laboratorio empleadas para conocer la interacción entre la caña de azúcar y *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & F. Oberw. (*Ustilago scitaminea* Sydow), agente causal del carbón. La resistencia a esta enfermedad, en la caña, está dada por diversos factores, entre los que se destacan, la activación de numerosas proteínas de resistencia además de otros genes relacionados con el proceso de patogénesis. Para el estudio de esta interacción se han utilizado diferentes herramientas, entre las que se encuentran: las histológicas, en las que se evalúan los trastornos de la célula ante la penetración del hongo, las bioquímicas, las cuales se caracterizan por cambios en la composición de diferentes sustancias antimicrobianas; las histoquímicas a través del marcaje *in situ* de proteínas específicas y las moleculares que permiten la identificación de transcritos que se activan o reprimen durante la interacción. Estas técnicas contribuyen a un mejor conocimiento de los mecanismos que participan durante la respuesta defensiva de la planta. Ello puede sentar las bases para el mejoramiento genético y además de poder ser utilizado como indicador en los programas de selección asistida por marcadores moleculares.

**Palabras clave:** Patogénesis, planta-patógeno, genes de resistencia, técnicas de laboratorio.

### ABSTRACT

**Techniques for the study of sugarcane-*S. scitamineum* interaction.** The main goal of this work was to review the tools and laboratory techniques employed to study the interaction of sugarcane and *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & F. Oberw. (*Ustilago scitaminea* Sydow), smut's causal agent. The sugarcane resistance to this disease is determined by several factors, among them the activation of several resistance proteins, and other related genes. This interaction has been studied with different tools, such as histological techniques for assessing the disruptions at the cellular level caused by fungus penetration; the biochemical ones used to detect changes in the composition of several antimicrobial substances, the histochemistry useful to stain *in situ* specific proteins, and molecular biology, which provides us with valuable tools to discover the activation or suppression of transcripts during the interaction. These approaches contribute to the better understandings of plant defense responses and to create molecular bases for genetic improvement to be applied as indicator in molecular assisted programs.

**Key words:** Pathogenesis, plant-pathogen, resistance genes, laboratory techniques.

<sup>1</sup> Recibido: 9 de febrero, 2010. Aceptado: 16 de mayo, 2011. Este trabajo formó parte de la Tesis Doctoral de la primer autora.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CUJAE Km 2 1/2. Boyeros. CP 19200. C. Habana, Cuba. Telef. 2624436. lao@inica.minaz.cu, mzardon@inica.minaz.cu, arielarencibia@inica.minaz.cu, eida@inica.minaz.cu, acevedo@inica.minaz.cu, mesa@inica.minaz.cu

## INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es afectada por múltiples microorganismos, entre ellos *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & F. Oberw. (*Ustilago scitaminea* Sydow) agente causal del carbón. Actualmente está presente en más de 64 países y regiones cañeras, en muchos de los cuales provoca daños significativos (China y Rodríguez 2010, Nzioki *et al.* 2010). Estos se incrementan en los retoños, producto de las infecciones secundarias y el aumento del nivel de inóculo que ocurre al romperse los látigos (estructura típica de la enfermedad) que contienen las esporas que son esparcidas por el viento y el agua (Magarey *et al.* 2006, INICA 2010).

La interacción planta-patógeno, en sentido general, ha sido ampliamente estudiada, en ella se produce un constante intercambio de información entre el hospedero y el patógeno, de esta forma la planta induce diversos mecanismos defensivos que determinan la naturaleza de la interacción (Van Loon *et al.* 2006, Bindschedler *et al.* 2009, Boller y He 2009, Kim *et al.* 2010). De la misma manera, los patógenos desarrollan los mecanismos que les posibilitan evadir y/o suprimir las respuestas defensivas de la planta. La influencia de esta presión selectiva conlleva al perfeccionamiento de sus mecanismos de defensa (Jones y Dangl 2006, Godfrey *et al.* 2009).

A pesar de que durante mucho tiempo fue controvertido el empleo del término “sistema inmune” para las plantas, en los últimos años, por la confirmación de la participación de diversas quinasas, entre otras moléculas que comparten homología con los sistemas de traducción de señales en los mamíferos, existe una fuerte tendencia a la utilización del mismo (Jones y Dangl 2006, DeYoung e Innes 2006, Boller y He 2009).

El modelo que sustenta el nuevo “Dogma central” de la patología de las plantas, describe el proceso evolutivo en cuatro etapas, donde las plantas en adición a sus barreras físicas y químicas constitutivas, primero tienen un “sistema inmune” que es capaz de detectar componentes genéricos conservados de muchos microorganismos (Bent y Mackey *et al.* 2007). En la segunda etapa, algunos microorganismos se adaptan a ciertas especies de plantas con la participación de factores de virulencia que pueden interferir con la activación de la respuesta general de defensa de la planta.

En la tercera etapa los patógenos adaptados son repelidos cuando el hospedero activa genes R específicos cuyos productos detectan indirectamente la defensa suprimiendo factores de virulencia por efecto del reconocimiento de proteínas específicas en el hospedero. Finalmente, el patógeno escapa de la detección de los productos de genes R eliminando los factores de virulencia detectados o suprimiendo la defensa inducida por los productos de genes R. Existen otros modelos que explican de modo similar el funcionamiento del “sistema inmune” de las plantas (Jones y Dangl 2006, DeYoung e Innes 2006).

Los mecanismos constitutivos de resistencia existen independientemente de la presencia del patógeno. En su mayoría son fenómenos estáticos, de naturaleza estructural o química, que dificultan la entrada del patógeno con lo cual previenen su ataque (Boller y He 2009). Incluyen barreras físicas como cutícula, pared celular y compuestos constitutivos químicos, los cuales pueden actuar como inhibidores del desarrollo de los patógenos y están ampliamente distribuidos en las plantas (compuestos fenólicos, alcaloides, diterpenoides, esteroides, glicoalcaloides y otros) (Chakravarthy *et al.* 2009, Zurbriggen *et al.* 2010).

Los llamados mecanismos inducidos por la infección constituyen un proceso dinámico, que puede manifestarse local o sistémicamente. Muchas de las respuestas inducibles son el resultado de la rápida reprogramación del transcriptoma a partir del reconocimiento de la presencia del patógeno (Walley y Desheh 2010). Entre las respuestas involucradas en el reconocimiento y eventos de señalización iniciales se encuentran: la despolarización de la membrana, reacciones oxidativas y reacción hipersensible (Torres 2010).

Existen respuestas de defensa inducidas localmente que involucran la síntesis de nuevas proteínas como consecuencia de la activación directa de los genes, la cual está mediada por el patógeno. Se desarrollan dentro de un grupo limitado de células, en la periferia del sitio de infección, de esta forma se restringe el crecimiento y el desarrollo del patógeno invasor; a través de las enzimas responsables de la vía de los fenilpropanoides, la inducción de fitoalexinas, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, polímeros que refuerzan la pared celular, entre otros (Boller y He 2009, Zurbriggen *et al.* 2010). También existen las respuestas de resistencia sistémica adquirida que ocurren

en sitios distantes del punto de interacción inicial con un patógeno (Loake y Grant 2007).

En el caso particular de la caña de azúcar, se conoce poco acerca de los procesos fisiológicos que ocurren en la planta durante las primeras horas postinoculación con *S. scitamineum*, los que son determinantes para el desarrollo de la enfermedad (La O *et al.* 2008). Por otra parte, no existen muchos trabajos encaminados a determinar genes de resistencia, mecanismos de acción del patógeno y mecanismos defensivos en la planta.

El objetivo del presente trabajo fue revisar las herramientas y técnicas de laboratorio empleadas para conocer la interacción entre la caña de azúcar y *S. scitamineum*.

### **Métodos utilizados en el estudio de la interacción caña de azúcar - *S. scitamineum***

Existen numerosos métodos enfocados al estudio de esta interacción, entre ellos se encuentran los histológicos, bioquímicos, histoquímicos y moleculares, estos nos brindan información de aspectos fenotípicos y genéticos específicos de este patosistema.

**Estudios histológicos:** Se apoyan en la microscopía óptica y electrónica para la búsqueda de rasgos fenotípicos, caracterización de variedades con diferentes grados de resistencia y evaluación de trastornos de las células ante el ataque de patógenos (Díaz-Vivancos *et al.* 2006).

En la caña de azúcar se determinaron componentes de la defensa constitutiva que están en correspondencia con la incidencia del carbón en el campo, entre los que se encuentran las características morfológicas de la yema tales como la ubicación del ápice con respecto al anillo de crecimiento y su abultamiento. En el caso que esté fuertemente encerrada dentro de la escama de la hoja, la hifa infectiva estará incapacitada para penetrar. Además, el número de tricomas es significativamente mayor en la variedad resistente (Waller 1970, Capote 2007).

En el proceso de penetración de *S. scitamineum* se agudizan los trastornos citopatológicos, con incrementos en el número de gránulos, vacuolas, ribosomas, retículos endoplasmáticos. Además, existen rupturas de membranas y paredes; así como desorganización de la estructura interna de las células y abundante producción de mucilago en las plantas susceptibles. En cambio en las variedades resistentes que se han inoculado

rompiendo las barreras físicas con el levantamiento de la escama de la yema el proceso de penetración del patógeno es más lento (Apezato *et al.* 1995, Capote 2007, Acevedo *et al.* 2007, Acevedo *et al.* 2008), lo cual puede estar relacionado con la inducción de mecanismos bioquímicos en la variedad resistente que impiden el rápido desarrollo de la infección.

**Estudios bioquímicos:** Se basan en el empleo de reacciones y determinaciones de sustancias específicas para llegar a conocer los cambios que ocurren tras la llegada del patógeno, también permiten caracterizar la composición de determinados metabolitos en variedades susceptibles y resistentes. Diversos son los estudios realizados durante la interacción caña de azúcar- *S. scitamineum*. Por ejemplo, Waller (1970) demostró la presencia de sustancias inhibitoras de la germinación de las esporas del hongo como fenilpropanoides y flavonoides. Por su parte, Lloyd y Naidoo (1983) observaron incrementos en la concentración de sustancias glicosídicas correlacionados con un mayor grado de resistencia de las plantas. También, se demostró que la infección de *S. scitamineum* en variedades de caña de azúcar susceptibles provoca incrementos notables en la actividad de las enzimas polifenoloxidasas, quitinasas, glucanasas, peroxidadas, así como cambios en la composición de poliaminas (Piñón *et al.* 1995). Lo anterior permitió a Piñón *et al.* (1997) proponer un modelo que relaciona los mecanismos constitutivos y bioquímicos inducidos durante la interacción de la caña de azúcar - *S. scitamineum*.

En otras investigaciones, Legaz *et al.* (1998) refirieron la producción de varias glicoproteínas, definidas como de mediano o alto peso molecular en jugo de caña de azúcar. Además, Martínez *et al.* (2000) describieron alteraciones en las concentraciones de polisacáridos solubles y glicoproteínas en jugos de variedades con diferentes grados de resistencia al carbón, las que habían sido inoculadas y cultivadas en condiciones de campo durante doce meses, observando incrementos en las variedades moderadamente resistentes y resistentes, así como disminución de los mismos en la variedad susceptible.

La germinación de las teliosporas de *S. scitamineum* disminuye en 50% después de cinco horas de estar en contacto con las glicoproteínas de las variedades resistentes. En estudios posteriores analizaron además, la actividad arginasa, quitinasa y peroxidasa en jugo de caña de azúcar de doce meses de edad inoculadas

con *S. scitamineum* encontrando incrementos de la producción de arginasa (Millanes *et al.* 2005, Legaz *et al.* 2005, Santiago *et al.* 2008).

Posteriormente, La O *et al.* (2007) observaron incrementos de intensidad en las isoenzimas superóxido dismutasas, peroxidasas, quitinasas y glucanasas en las muestras de seis y veinticuatro horas postinoculación en la variedad resistente, corroborando los resultados alcanzados por Piñón *et al.* (1995), por lo que se sugiere que estas enzimas participan indirectamente en el evento de señalización de la respuesta defensiva. Esto coincide con el proceso de penetración del patógeno, el que transcurre a partir de las seis horas postinoculación (Alexander y Ramakisham 1980, Acevedo y Piñón 1996). Sin embargo, la síntesis de estas enzimas disminuye a partir de las 72 horas postinoculación, lo que podría ser consecuencia directa de cambios en la actividad transcripcional de sus correspondientes genes, para compensar el metabolismo energético o la degradación por enzimas proteolíticas o inhibidores producidos por el patógeno. En diversos estudios realizados se comprobó que en el patosistema caña de azúcar- *S. scitamineum* el incremento en la actividad de las enzimas oxidativas está unido a la acumulación de compuestos fenólicos, ácido salicílico y de glicoproteínas asociadas a carbohidratos de mediano peso molecular (Fontaniella *et al.* 2002, Armas *et al.* 2007, Santiago *et al.* 2008).

Este complejo proceso de activación de la respuesta defensiva es coordinado tanto temporal como espacialmente, para asegurar que sólo las células necesarias desvíen su metabolismo en el tiempo requerido (Zurbriggen *et al.* 2010). En numerosas interacciones existen isoformas particulares de proteínas que se activan de forma rápida y durante un corto período de tiempo, particularmente dentro de las 24 a 72 horas postinoculación, para contrarrestar los daños que ocurren a la llegada del patógeno (Bari y Jones 2009, Zurbriggen *et al.* 2010).

En otros estudios de interacciones hospedante-patógeno se asocian las enzimas oxidativas (superóxido dismutasas, peroxidasas y polifenoloxidasas) e hidrolíticas (quitinasas y glucanasas) con los mecanismos de resistencia (Nittler *et al.* 2006, Boava *et al.* 2010).

La acumulación diferencial de oligosacáridos es otro elemento a tener en cuenta durante la interacción planta-patógeno (Galletti *et al.* 2008). En el caso particular caña de azúcar-*S. scitamineum*, en las primeras veinticuatro horas aumentó la concentración de los

mismos, lo que podría ser uno de los vínculos con otras vías metabólicas más complejas responsables de la resistencia de este cultivo al ataque de este hongo (La O 2007), por lo que sería importante la purificación de las fracciones diferenciales, para su posible aplicación práctica en la búsqueda de resistencia sistémica adquirida.

**Estudios histoquímicos:** Estos permiten identificar *in situ*, proteínas y sustancias antimicrobianas, mediante la combinación de reacciones color específicas y su localización celular por microscopía óptica y electrónica. La O (2007) localizó los sitios específicos de  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas en yemas de caña de azúcar por inmunofluorescencia indirecta a las 24 horas postinoculación, en variedades resistentes. Dichas enzimas estuvieron ausentes en la variedad susceptible. Es la primera vez que se utilizó esta técnica en este cultivo, se ratificó su utilidad en la determinación de macromoléculas de origen vegetal y en particular contribuyó al estudio de los procesos fisiológicos durante los estadios iniciales de la infección con *S. scitamineum*.

En el caso particular de la interacción caña de azúcar- *S. scitamineum*, Capote (2007) observó la formación de bandas de fenoles en las capas externas de la pared celular, en los sitios cercanos al ataque de este patógeno, por lo que se confirmó la participación de dichos compuestos en la respuesta defensiva de la planta.

**Estudios moleculares:** Muchos nuevos componentes de la cascada de traducción de señales han sido identificados por herramientas genéticas. La Genómica y Proteómica funcional se están convirtiendo en áreas de expansión para estas investigaciones (Godfrey *et al.* 2009, Bindschedler *et al.* 2009, Kim *et al.* 2010). Actualmente se conoce que existe una respuesta dentro de las especies que involucran varios componentes, de los cuales no todos son específicos contra el patógeno individual, sino que se inducen ante cualquier situación de estrés, abiótico y biótico (Bent y Mackey 2007, Bari y Jones 2009, Chakravarthy *et al.* 2009).

Se han realizado varios estudios *in silico*, buscando genes de resistencia constitutivos en diferentes especies de plantas cultivadas (Barbosa da Silva *et al.* 2005, Wanderley-Nogueira *et al.* 2007). En caña de azúcar se identificaron 280 genes de resistencia, los que incluyen todos los dominios conservados excepto el LRR-NBS-TIR (del inglés "Leucine Rich Repeat-Nucleotide Binding Site and Toll interleucine 1-

receptor), que hasta la actualidad no se ha identificado en monocotiledóneas. Estos genes no inducidos fueron encontrados fundamentalmente en flores, en los tejidos de transición de raíces a tallos y en raíces (Wanderley-Nogueira *et al.* 2007).

En cuanto a la identificación de secuencias expresadas diferencialmente durante la interacción caña de azúcar-*S. scitamineum*, entre los trabajos pioneros en este sentido están los realizados por Heinze *et al.* (2001), a los siete días postinoculación, donde analizaron a través de la técnica de hibridación sustractiva, secuencias diferencialmente expresadas y detectaron el factor de transcripción X1, una taumatina ácida constitutiva, tres receptores similares a quinasas y secuencias homólogas a genes que participan en el metabolismo de los fenilpropanoides y flavonoides. Estos resultados coinciden con lo planteado por Lloyd y Naidoo (1983), relacionado con la participación de dichos compuestos en la resistencia al carbón.

Otros estudios han empleado la técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados de ADN complementario (AFLP-ADNc) (del inglés "Amplified Fragment Length Polymorphism") para obtener bibliotecas de caña de azúcar (con variedades susceptibles y resistentes) infectadas con *S. scitamineum* a los siete días postinoculación (Thokoane y Rutherford 2001, Butterfield *et al.* (2004). Estos autores secuenciaron diversos fragmentos derivados de transcritos, con similitud a una región repetitiva terminal de un retrotransposón, proteínas quinasas y receptores de quinasas. Este último tuvo una alta homología con un receptor quinasa que participa en la detección de la integridad de la pared celular durante la patogénesis. Este tipo de receptor es inducido por el ácido salicílico y modera su actividad, lo cual sugiere la participación de dicha vía de señalización en la respuesta de la caña de azúcar a *S. scitamineum* (Heinze *et al.* 2001). Además, resultados alcanzados por Pitzschke y Hirt (2009) destacan el alto nivel de interconexión de las vías del salicílico con la cascada de las quinasas y la explosión oxidativa.

Por otra parte, se identificaron genes relacionados con la resistencia a enfermedades LRRS-NBS, con la reacción de hipersensibilidad (ntpAT), con la vía de las auxinas y el etileno en somaclones de caña de azúcar resistentes al carbón, a los dos meses postinoculación (Borrás *et al.* 2005).

Estudios posteriores analizaron la respuesta inducida en los primeros tres días de inoculación con el

patógeno (La O *et al.* 2008), en los que se determinó que se inducen diferencialmente fragmentos polimórficos derivados de transcritos (TDF), en la variedad resistente y en la susceptible. En el genotipo susceptible se detectaron genes a tiempo cero y luego dejaron de expresarse, lo que puede ser consecuencia de un desorden general producido tras la infección con *S. scitamineum*, que puede ser explicado con las observaciones realizadas por Acevedo *et al.* (2008), sobre los cambios morfológicos asociados con la penetración del patógeno. Es posible que la planta susceptible sea incapaz de activar sus defensas, lo hace tardíamente o las reprime, debido a la producción de toxinas o inhibidores del hongo, que le permiten su exitosa colonización de los tejidos.

Los TDFs identificados por La O *et al.* (2008), pudieron agruparse en: señalización, resistencia a enfermedades y desarrollo y mantenimiento celular.

En el grupo de señalización se incluyen los genes que participan en la respuesta oxidativa, por lo que en la interacción caña de azúcar-*S. scitamineum* es posible inferir que ocurren cambios en el flujo de iones H<sup>+</sup>, por la activación de una ATPasa. Estos resultados concuerdan con los encontrados en otros organismos (Polesani *et al.* 2008, Chapman *et al.* 2009).

La explosión oxidativa puede activar genes de enzimas antioxidantes en los tejidos vecinos al sitio inicial de penetración, lo que permite establecer la posible relación del TDF similar al gen *pox N peroxidasa* en la respuesta de resistencia de la caña de azúcar contra el carbón. Este gen está vinculado a la vía de los fenilpropanoides durante la síntesis de lignina, donde se producen metabolitos intermediarios con elevada actividad antimicrobiana e incremento de la polimerización de los monómeros en las paredes celulares y por tanto aumento de la barrera física (Heinze *et al.* 2001). Además, este TDF podría inducir otros transcritos que se expresan diferente en dicha interacción, como las proteínas quinasas, genes de etileno y vía de la auxina; así como otros relacionados con la fotosíntesis y el metabolismo celular (La O *et al.* 2008).

En la interacción caña de azúcar-*S. scitamineum* La O *et al.* (2008), también sugieren la participación del Ca<sup>2+</sup> como segundo mensajero en los procesos celulares que se llevan a cabo posteriores a la inoculación en la variedad resistente, mediante la activación de proteínas quinasas dependientes de este catión.

En las plantas se observan incrementos en la concentración de Ca<sup>2+</sup> como respuesta a varios estímulos,

incluidas bajas temperaturas, luz, estrés oxidativo, hormonas y elicitores. El  $\text{Ca}^{2+}$  media diferentes procesos celulares específicos en el crecimiento y desarrollo, lleva la señal del exterior al interior de la célula, a través de cambios en su concentración (Jeworutzki *et al.* 2010, Kim *et al.* 2010).

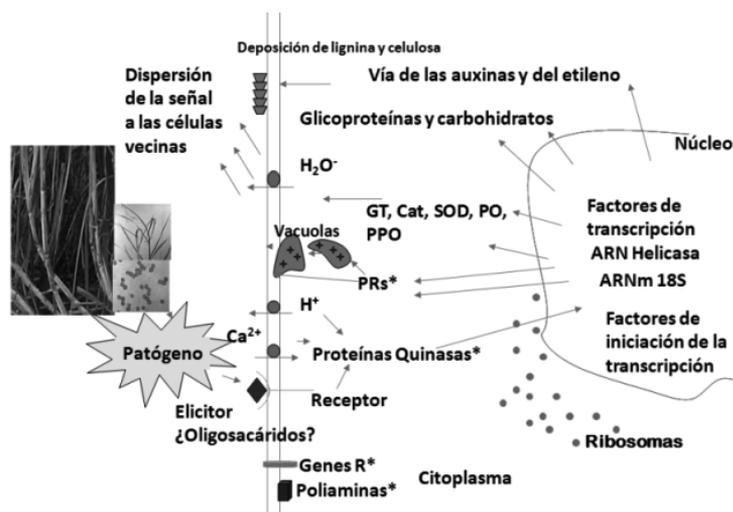
Se determinaron seis TDFs relacionados con las vías de señalización por etileno y auxina (La O *et al.* 2008). Estas hormonas, además de sus funciones fisiológicas en los diferentes estados de desarrollo de la planta, se expresan en respuesta a distintos tipos de estreses; tales como, daños mecánicos por heridas, compuestos químicos, metales, drogas, temperaturas extremas e infecciones por patógenos (Van Loon *et al.* 2006).

La resistencia a esta enfermedad se encontró fundamentalmente asociada a las proteínas relacionadas con la patogénesis PRs 1, 2, 3 y 5; y el de la cinamil alcohol deshidrogenasa (La O *et al.* (2008). La identificación de varios de estos genes corroboraron algunos resultados obtenidos por otros investigadores, entre ellos Heinze *et al.* (2001) y Borrás *et al.* (2005) que identificaron un gen PRs 5 que se expresó constitutivamente en el genotipo resistente.

La rápida e intensa acumulación de PRs se puede utilizar por la planta resistente para degradar directamente las paredes celulares del hongo e inhibir su

crecimiento y diseminación, lo que coincide con los resultados alcanzados en diferentes interacciones planta-patógeno (Elvira *et al.* 2008, Boava *et al.* 2010). Por tanto, se puede sugerir la relación de estas enzimas con los mecanismos de resistencia de la caña de azúcar a *S. scitamineum* los que desempeñarían importantes funciones, en combinación con otros mecanismos en la respuesta defensiva. Se observó también que se activan diferencialmente en la variedad resistente varios fragmentos con homología a genes relacionados con el mantenimiento y desarrollo celular (La O *et al.* 2008). Estos resultados corroboran una vez más los complejos cambios citopatológicos que ocurren durante la interacción caña de azúcar- *S. scitamineum*, así como los genes involucrados en varias rutas metabólicas que permiten establecer relaciones con los mecanismos defensivos de la planta y coincide con lo planteado por Wanderley-Nogueira *et al.* (2007) sobre el alto nivel de coordinación entre diferentes vías de señalización en caña de azúcar.

Todos los estudios realizados en esta interacción permiten trazar un modelo acerca de los cambios fisiológicos durante las 72 horas iniciales de la interacción caña de azúcar-*S. scitamineum*, las que son determinantes para el desarrollo de la enfermedad (Figura 1). A la llegada del patógeno ocurre el reconocimiento y posteriormente deben liberarse oligosacáridos de la



**Figura 1.** Modelo de los cambios histopatológicos durante las primeras 72 horas de la interacción caña de azúcar-*S. scitamineum*. Donde GT: Glutatioión Transferasas, Cat: Catalasas, SOD: Superóxido Dismutasas, PO: Peroxidasas, PPO: Polifenol Oxidasas, PRs: Proteínas relacionadas con la patogénesis, Genes R: Genes de Resistencia (La O 2007). Cuba

planta, que pudieran actuar, a su vez, como elicitores. Las señales iniciales de alarma provocarían cambios en el flujo de iones y activación de varias quinasas que participan en la amplificación de la señal al núcleo, lo que implica la activación de varios factores iniciadores y reguladores de la transcripción, por lo tanto la activación de numerosos mecanismos defensivos de la planta de forma coordinada, tal es el caso de la detección, en la variedad resistente inoculada, de incrementos de las PRs 1, 2, 3 y 5, que tienen efectos antimicrobianos y elicitores de las respuestas defensivas, por la liberación de fragmentos derivados de paredes celulares (Thokoane y Rutherford 2001, Butterfield *et al.* 2004, La O *et al.* 2007, La O *et al.* 2008).

### Aplicación y perspectivas de este conocimiento

El conocimiento de los detalles moleculares de la fisiopatología de las interacciones planta-patógeno, tales como los genes requeridos para desarrollar las infecciones, las vías de señalización y respuestas defensivas efectivas del hospedante; mediante la caracterización con microarreglos y análisis de función de genes, con ARN de interferencia, se podrían utilizar para el diseño de nuevas estrategias en la protección de las plantas. Además, aumentaría la eficiencia en la obtención de variedades en los programas asistidos por marcadores moleculares, ya que estos últimos tienen la ventaja de acortar los períodos de selección a través del empleo de genes diferencialmente expresados, asociados con la resistencia a enfermedades. En este sentido, se propone el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores diseñados a partir de secuencias conservadas de genes de resistencia para buscar múltiples genes con esta función (Que *et al.* 2006).

Actualmente, se está desarrollando una investigación bioinformática donde se analizan varias secuencias de fragmentos polimórficos derivados de transcritos para identificar los genes específicos del patosistema caña de azúcar - *S. scitamineum*, además de aquellos que están vinculados de manera general a situaciones de estrés.

## LITERATURA CITADA

- Acevedo, R; Piñón, D. 1996. Diagnóstico del carbón de la caña de azúcar por inmunofluorescencia indirecta. *Rev. Iberoamericana de Micología* 13:8-9.
- Acevedo, R; Fajardo, M; Pérez, S; Piñón, D. 2007. La microscopía electrónica en estudios fisiopatológicos de plantas con importancia económica para Cuba. *Acta Microscópica* 16, Supl. 2:235-236.
- Acevedo, R; Capote, M; La O, M; Piñón, D; Rodríguez, E. 2008. Histopatología del proceso de penetración del hongo *Sporisorium scitamineum* en caña de azúcar. *In XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas y I Congreso Internacional de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas*. Córdoba, Argentina. p. 9-13.
- Alexander, KC; Ramakisham, K. 1980. Infection of the bud, establishment in the host and production of whips in sugarcane (*Ustilago scitaminea*). *Proc. Int. Soc. Sug. Technol.* 17:1453-1455.
- Apezato, BA; Capote, AM; Amorin, L. 1995. Structural characteristics of buds of sugarcane cultivars with different levels for resistance to smut. *J. Plant Disease and Protection* 102(5):502-508.
- Armas, R de; Santiago, R; Legaz, ME; Vicente, C. 2007. Levels of phenolic compounds and enzyme activity can be used to screen for resistance of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *Australasian Plant Pathology*. 36: 32-38.
- Barbosa da Silva, A; Wanderley-Nogueira, AC; Silva, RRM; Belarmino, LC; Soares-Cavalcanti, NM; Benko-Iseppon, AM. 2005. *In silico* survey of resistance (R) genes in *Eucalyptus* transcriptome. *Genet. Mol. Biol.* 28:562-574.
- Bari, R; Jones, JD. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol.* 69(4):473-488.
- Bent, AF; Mackey, D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:399-436.
- Bindschedler, LV; Burgis, TA; Mills, DJ; Ho, JT; Cramer, R; Spanu, PD. 2009. In plant proteomics and proteogenomics of the biotrophic barley fungal pathogen *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *Mol Cell Proteomics.* 8(10):2368-2381.
- Boava, LP; Kuhn OJ; Pascholati, SF; Di Piero, RM; Furtado, EL. 2010. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. *Tropical Plant Pathology* 35(2):124-128.
- Boller, T; He, SY. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science.* 324:742-744.

- Borrás, O; Thomma, BP; Carmona, E; Borroto, CJ; Pujol, M; Arencibia, A; López, J. 2005. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. *Plant Physiol. and Biochem.* 43:1115-1121.
- Butterfield, MK; Rutherford, RS; Carson, DL; Hockett, BI. 2004. Application of gene discovery to varietal improvement in sugarcane, South Afri. *J. Bot.* 70: 167-172.
- Capote, M. 2007. Bases morfofisiológicas de la interacción carbón- caña de azúcar. Tesis presentada en opción al Título Académico de Maestro en Ciencias. Universidad de la Habana. 56 p.
- Chapman, NH; Burt, C; Nicholson, P. 2009. The identification of candidate genes associated with *Pch2* eyespot resistance in wheat using cDNA-AFLP. *Theor. Appl. Genet.* 118:1045-1057.
- Chakravarthy, S; Velásquez, AC; Martin, GB. 2009. Assay for pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (PTI) in plants. *J. Vis. Exp.* 9(31). doi: 10.3791/1442.
- China, A; Rodríguez, E. 2010. Enfermedades de la caña de azúcar. 2 ed. Habana Cuba, Edición Publica. p. 152.
- DeYoung, BJ; Innes, RW. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.* 7:1243-1249.
- Díaz-Vivancos, M; Mesonero, P; Periago, A; Ros Barcelo, A; Martínez-Gómez, P; Hernández, J. 2006. The apoplastic antioxidant system in Prunus: response to long-term plum pox virus infection. *J. Exp. Bot.* 57(14): 3813-3824.
- Elvira, MI; Molina-Galdeano, M; Gilardi, P; García-Luque, I; Serra, MT. 2008. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/ern032.
- Fontaniella, B; Márquez, A; Rodríguez, CW; Piñón, D; Solas, MT; Vicente, C; Legaz, ME. 2002. A role for sugarcane glycoproteins in the resistance of sugarcane to *Ustilago scitaminea*. *Plant Physiol. Biochem* 40: 881-889.
- Galletti, R; Denoux, C; Gambetta, S; Dewdney, J; Ausubel FM; De Lorenzo G; Ferrari S. 2008. The atrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 148:1695-1706.
- Godfrey, D; Zhang, Z; Saalbach, G; Thordal-Christensen, H. 2009. A proteomics study of barley powdery mildew haustoria. *Proteomics* 9(12):3222-3232.
- Heinze, BS; Thokoane, LN; Williams, CN; Barnes, JM; Rutherford, RS. 2001. The smut- sugarcane interaction as a model system for the integration of marker discovery and gene isolation. *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.* 75:88-93.
- INICA (Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar). 2010. Informe de la XX Reunión de Variedades, Semillas y Sanidad Vegetal. Sancti Spiritus. Edición Publica 2010. 80 p.
- Jeworutzki, E; Roelfsema, MR; Anschutz, U; Krol, E; Elzenga, JT; Felix, G; Boller, T; Hedrich, R; Becker, D. 2010. Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca<sup>2+</sup>-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J.* 62(3):367-378.
- Jones, JDG; Dangl, JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kim, TH; Böhmer, M; Hu, H; Nishimura, N; Schroeder, JI. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2(61):561-591.
- La O, M. 2007. Contribución a la caracterización molecular de la interacción *Saccharum* spp.-*Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & F. Oberw. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Villa Clara, Cuba. 104 p.
- La O, M; Arencibia, A; López, R; Acevedo, R; Rodríguez, E; León, O. 2007. Proteínas relacionadas con la patogénesis en la interacción caña de azúcar-*S. scitamineum*. *Revista Agronomía Mesoamericana* 18(2):197-203.
- La O, M; Arencibia, A; Vinagre, F; Fernández, M; Acevedo, R; López, R; Rodríguez, E; Hormaza, J; Carmona, E; León, O; Santana, I. 2008. "Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum spp* after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. *Plant Cell Reports* 27(6):1103-1111.
- Legaz, ME; Pedrosa, MM; de Armas, R; Rodríguez, CW; de los Ríos, V; Vicente, C. 1998. Separation of soluble glycoprotein from sugarcane juice by capillary electrophoresis. *Anal. Chem. Acta.* 372:201-208.
- Legaz, ME; de Armas, R; Millanes, AM; Rodríguez, CW; Vicente, C. 2005. Heterofructans and heterofructan-containing glycoproteins from sugarcane: structure and function. *Research and Development Biochemistry* 6:31-51.

- Lloyd, HL; Naidoo, M. 1983. Chemical assay potentially suitable for determination of smut resistance of sugarcane cultivars. *Plant Disease* 67:1103-1105.
- Loake, G; Grant, M. 2007. Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol.* 10(5):466-472.
- Magarey, R; Croft, B; Braithwaite, K; James, A. (2006). A smut incursion in the major Eastern-Australian sugarcane production area. p. 333-336. *In* Li, YR; Solomon, S. eds. *Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries*. PR. China. Agriculture Press Beijing, China. 882 p.
- Martínez, M; Medina, I; Naranjo, S; Rodríguez, CW; de Armas, R; Piñón, D; Vicente, C; Legaz, ME. 2000. Changes of some chemical parameters, involved in sucrose recovery from sugarcane juices, related to the susceptibility or resistance of sugarcane plants to smut (*Ustilago scitaminea*). *Intern. Sugar J.* 102:445-448.
- Millanes, AM; Fontaniella, B; Legaz, ME; Vicente, C. 2005. Glycoproteins from sugarcane plants regulate cell polarity of *Ustilago scitaminea* teliospores. *Journal of Plant Physiology* 162:253-265.
- Nittler, MP; Hocking-Murray, D; Foo, CK; Sil, A. 2005. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol. Biol. Cell.* 16:4792-4813.
- Nzioki, HS; Jamoza, JE; Olweny, CO; Rono, JK. 2010. Characterization of physiologic races of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. *African Journal of Microbiology Research.* 4(16):1694-1697.
- Piñón, D; Acevedo, R; Capote, M; Héctor, E; De Prada, A. 1995. Mecanismos de resistencia de la caña de azúcar al carbón. Informe científico. Archivos Vicedirección Ciencia y Técnica. Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Edición Publicina. 1995. 53 p.
- Piñón, D; de Armas, R; Acevedo, R; Capote, M; Córdova, C. 1997. Bases para la resistencia del carbón de la caña de azúcar. *In* Premio Anual de la Academia de Ciencias Territorial Habana. Cuba. 40 p.
- Pitzschke, A; Hirt, H. 2009. Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiology* 149:606-615.
- Polesani, M; Desario, F; Ferrarini, A; Zamboni, A; Pezzotti, M; Kortekamp, A; Polverari, A. 2008. cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9:142. doi:10.1186/1471-2164-9-142.
- Que, Y; Lin, J; Zhang, J; Gu, Y; Ruan, M; Chen, T; Chen, R; Xu, L; Zhang, M. 2006. Cloning and analysis of NBS class disease resistance gene analogous in sugarcane. p. 623-628. *In* Li, YR; Solomon, S. eds. *Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries*. PR. China. Agriculture Press Beijing, China. 882 p.
- Santiago, R; Armas, R de; Legaz, ME; Vicente, C. 2008. Separation from *Ustilago scitaminea* of different elicitors which modify the pattern of phenolic accumulation in sugarcane leaves. *Journal of Plant Pathology* 90(1):87-96.
- Thokoane, LN; Rutherford, RS. 2001. cDNA-AFLP differential display of sugarcane (*Saccharum spp.* hybrids) genes induced by challenge with the fungal pathogen *Ustilago scitaminea* (sugarcane smut). *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.* 75:104-107.
- Torres, MA. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiol. Plant.* 138(4):414-429.
- Van Loon, LC; Geraats, BPJ; Linthorst, HJM. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Sci.* 11:184-191.
- Waller, DIT. 1970. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. II. Infection and resistance. *Transactions of the British Mycological society* 54:405-414.
- Walley, JW; Dehesh, K. 2010. Molecular mechanisms regulating rapid stress signaling networks in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant. Biol.* 52(4):354-359.
- Wanderley-Nogueira, AC; Soares-Cavalcanti, NM; Morais, DAL; Belarmino, LC; Barbosa-Silva A; Benko-Iseppon, AM. 2007. Abundance and diversity of resistance genes in the sugarcane transcriptome revealed by in silico analysis. *Genetics and Molecular Research.* 6(4):866-889.
- Zurbriggen, MD; Carrillo, N; Hajirezaei, MR. 2010 ROS signaling in the hypersensitive response: When, where and what for? *Plant. Signal Behav.* 26:5(4). [Epub ahead of print].