



Alteraciones estructurales producidas en yemas de caña de azúcar durante el proceso de infección del hongo *Ustilago scitaminea*

Ricardo Acevedo Rojas¹ y Neusa de Lima Nogueira²

¹Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar y ²Centro de Energía Nuclear en Agricultura, Universidade de São Paulo, Brasil

Resumen

En el presente trabajo se estudiaron los cambios estructurales que se producen en yemas de caña de azúcar durante la infección con *Ustilago scitaminea*. Yemas de los cultivares SP79-2312 y NA56-79, resistente y susceptible al mencionado hongo, fueron inoculadas con teliosporas de *U. scitaminea*. Se colocaron en bandejas, mantenidas en oscuridad a 31 °C y 80% de humedad relativa. Se dejaron como controles 30 yemas de cada cultivar sin inocular. Los muestreos se realizaron a las 16, 40 y 72 h después de la inoculación, tomando 10 yemas inoculadas de cada cultivar e igual número de sanas. Los tejidos se fijaron en glutaraldehído y tetróxido de osmio, después fueron deshidratados en acetona e incluidos en resina Spurr. Se realizaron cortes transversales semifinos y ultrafinos, que fueron observados en microscopios de luz y electrónico. Se comprobó que a pesar de haber roto la barrera de resistencia de SP79-2312, por el método de inoculación empleado, el desarrollo del hongo en este cultivar resistente fue siempre más lento que en el susceptible NA56-79. A las 14 h después del inóculo, no se observó el hongo en el cultivar resistente, y en el susceptible fue escaso, a las 40 h se apreció un incremento en la cantidad de hifas y más aún a las 72 h. Los daños en la estructura celular fueron más drásticos desde el segundo muestreo, incrementándose en el último. Las alteraciones detectadas fueron: formación de gránulos electrodensos en el interior de las células, incremento de vacuolas, vesículas y retículo endoplásmico, así como ruptura de membranas.

Palabras clave

Carbón, *Ustilago scitaminea*, Caña de azúcar, Ultraestructura, Citopatología

Structural changes in sugar cane buds during infection by the fungus *Ustilago scitaminea*

Summary

The structural changes that take place in sugar cane buds during the infection with *Ustilago scitaminea* were studied. Buds of the cultivars SP79-2312 and NA56-79, resistant and susceptible to this fungus, were inoculated with teliospores of *U. scitaminea*. They were placed in trays and maintained in darkness at 31 °C and 80% relative humidity. Thirty buds of each cultivar left without inoculation, taking 10 inoculated buds of each cultivar and same number of healthy buds. The tissues were fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide, later they were dehydrated in acetone and embedded in Spurr resin. Semi-fine and ultra-

Dirección para correspondencia:

Dr. Ricardo Acevedo Rojas
Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar
Carretera Central Martínez Prieto, Km 2 1/2
Municipio Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba
Tel.: +53 683 2391
Fax: +53 7 666 030
e-mail: acevedo@inica.edu.cu

Aceptado para publicación el 24 de Julio de 2002

fine transverse sections were prepared, and were observed in light and electron microscopes respectively. It was proven that in spite of having broken the barrier of resistance of SP79-2312, for the inoculation method used, always the development of the fungus in this resistant cultivar was slower than in the susceptible one NA56-79. At 14 h post-inoculation, the fungus was not observed in the resistant cultivar, and it was scarce in the susceptible one. At 40 h an increment in the quantity of hyphae was noticed and even more at 72 h. The damages in the cellular structure were more drastic from the second sampling, being increased in the last one. The detected alterations were: formation of electron-dense granules inside the cells, increment of vacuoles, vesicles and endoplasmic reticulum cisternae, as well as rupture of membranes inside of the cells.

Key words Smut, *Ustilago scitaminea*, Sugarcane, Ultrastructure, Cytopathology

El carbón de la caña de azúcar es una de las principales enfermedades que afectan a este cultivo. Su agente causal es el hongo *Ustilago scitaminea* Sydow el cual está presente en casi todos los países productores de caña. Este patógeno provoca una reducción entre 17 y 22% del rendimiento agrícola, pudiendo llegar hasta un 50% en cultivares susceptibles, además afecta la calidad y cantidad del jugo que se extrae de los tallos para la elaboración del azúcar [1,2]. El síntoma típico de esta enfermedad es la formación en la yema terminal de una estructura en forma de látigo, que porta las esporas del hongo. También se produce proliferación de las yemas laterales y formación de plantones herbáceos.

En estudios histológicos sobre la infección, se ha comprobado que ésta no se disemina dentro de la planta por los vasos del xilema, sino que lo hace célula a célula, ya que estos vasos tienen una alta concentración de sales que inhiben el desarrollo del hongo [3].

Por la importancia de *U. scitaminea* en la caña de azúcar, se han llevado a cabo diferentes investigaciones sobre la interacción patógeno-hospedero, tales como el incremento de las poliaminas y los fenoles en plantas infectadas [4,5]; el aumento de las glicoproteínas en los jugos de caña como un factor de resistencia al carbón [6]; la caracterización molecular del patógeno [7] y un método para el diagnóstico del mismo por técnicas moleculares [8]. Además se implementó la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección del patógeno y se determinó que las teliosporas del hongo pueden germinar a partir de las 6 h posteriores a la inoculación [9].

Estudios fisiopatológicos para conocer la interacción hospedante-patógeno, se han realizado en caña de azúcar con diferentes enfermedades, como son el mosaico [10], el raquitismo de los retoños [11] y el carbón [12], entre otros. Como se puede apreciar son numerosos y disímiles los estudios que se han realizado sobre este microorganismo, con vistas a conocer más sus características y así lograr un mejor control de la enfermedad.

En los vegetales, como en los animales, los sistemas de membranas juegan un importante papel en las células, ya que forman parte de la estructura del protoplasto y constituyen el plasmalema, tonoplasto y, según algunos investigadores, también el retículo endoplásmico, dictiosomas y otras estructuras [13]. Estas membranas son altamente sensibles a la acción de los patógenos, sobre todo hongos [14]. El número y actividad de diferentes orgánulos celulares puede verse afectado en células infectadas con microorganismos [15].

El presente trabajo tiene como objetivo describir las alteraciones que se producen en yemas de caña de azúcar durante la infección con el hongo *U. scitaminea*.

El trabajo se realizó en el Centro de Energía Nuclear para la Agricultura (CENA) de la Universidad de Sao Paulo, Brasil. Se utilizaron tallos de nueve meses de edad de dos cultivares de caña de azúcar, SP79-2312 (resistente al carbón) y NA56-79 (susceptible). Se cortaron en secciones individuales de una yema y se colocaron en bandejas con un lecho húmedo de algodón y papel, manteniéndolas en la oscuridad a 31 °C y 80% de humedad relativa. Se inocularon con una mezcla de teliosporas de carbón, que fueron colectadas en diferentes plantas infectadas del campo y se les agregó una pequeña cantidad de agua estéril para formar una pasta concentrada de teliosporas, que fue colocada encima de las yemas y con una aguja entomológica se le hicieron pequeños agujeros, para facilitar la entrada del hongo. Se dejaron sin inocular 30 yemas de cada cultivar como controles.

Los muestreos fueron realizados a las 16, 40 y 72 h después de la inoculación. Se procesaron 10 yemas sanas y 10 inoculadas de los cultivares, en cada muestreo. Antes de hacer la extracción de las yemas, se lavaron bien con un hisopo para eliminar todas las esporas y fueron separadas varias de las escamas superiores.

Los tejidos se fijaron durante 18 h en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,2 M, pH 7,2, realizándose posteriormente otra fijación de 3 h en tetróxido de osmio al 2% en el mismo tampón. Se hizo precontraste con acetato de uranilo acuoso al 3% por 2 h y se deshidrataron en series crecientes de acetona. La inclusión fue en resina Spurr [16].

En un ultramicrotomo Blumm, Sorval MT-1 (Reino Unido) se realizaron cortes transversales semifinos (0,5-1,0 µm) y ultrafinos (60-90 nm). Los primeros fueron teñidos con azul de metileno al 1% y los ultrafinos contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo [17].

Las observaciones de los cortes semifinos se realizaron en un microscopio óptico Olympus BH 2 (Japón) y los ultrafinos en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-900 (Alemania) a diferentes aumentos.

En las observaciones realizadas al microscopio electrónico no se encontraron diferencias ultraestructurales entre las yemas controles de los dos cultivares.

En cuanto a las muestras infectadas con *U. scitaminea* se pudo constatar que el método de inoculación empleado fue drástico, lográndose la infección en los dos cultivares. Por lo que se rompió la barrera de resistencia

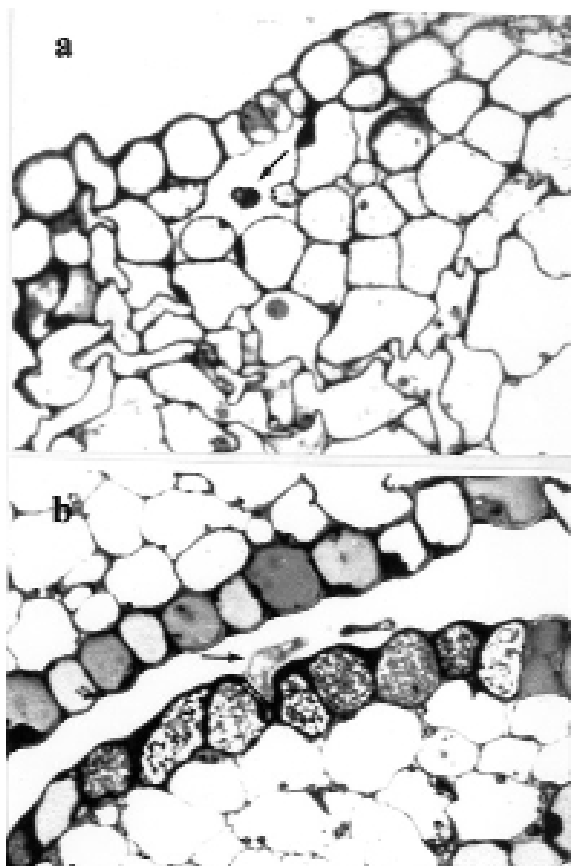


Figura 1. Localización del hongo en yemas de caña de azúcar del cultivar susceptible (NA56-79): a. Espora de *Ustilago scitaminea* comenzando a germinar (flecha) en el interior de una cavidad estomática (1.400x); b. Hifa de *U. scitaminea* (flecha) penetrando entre células epidérmicas (1.400x).

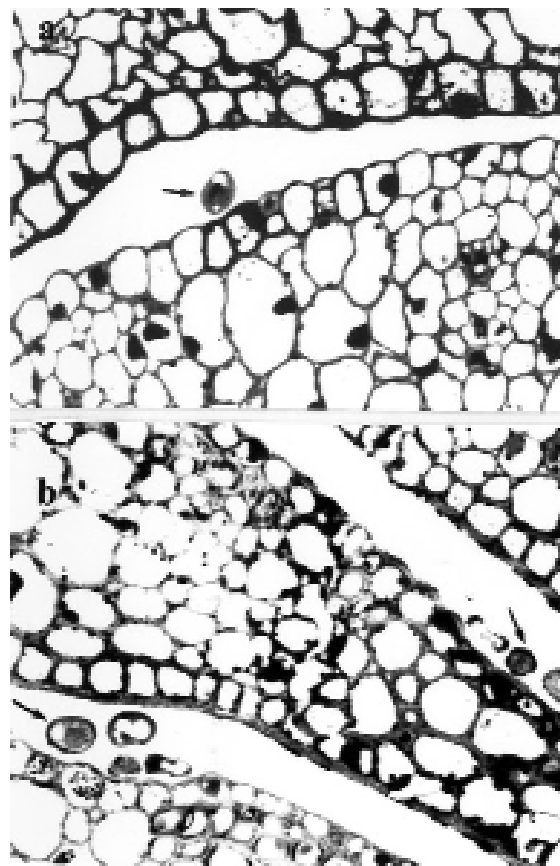


Figura 2. Cortes semifinos de yemas de los dos cultivares estudiados a las 72 h posteriores a la inoculación. En SP79-2312, que es resistente, hay una presencia menor del hongo (a) que en el cultivar susceptible NA56-79 (b). 1.400x.

morfológica que presentó el cultivar SP79-2312 frente al carbón.

La penetración del patógeno dentro del tejido se produjo tanto por la abertura estomática, como por las células epidérmicas (Figura 1). La espora germina y produce hifa infectiva, que forma el micelio del hongo.

En el primer muestreo (16 h después de la inoculación) no fueron encontradas hifas del hongo en el cultivar resistente, pero sí en el susceptible (NA56-79), donde la presencia del hongo, aunque escasa, fue apreciable. En el segundo muestreo (40 h post-inoculación) se encontró siempre mayor número de hifas en el cultivar susceptible con respecto al resistente. A las 72 h después de la inoculación (tercer muestreo), aunque no fue cuantificado, se pudo observar más cantidad de hifas en ambos cultivares, pero sobre todo en NA56-79 fue más evidente (Figura 2).

En el primer muestreo, el cultivar NA56-79 no presentó daños ultraestructurales considerables en el tejido. Pero a las 40 h post-inoculación se observaron alteraciones en el mismo, producidas por el hongo, como la presencia de gránulos en el citoplasma celular. En el tercer muestreo se observó, en los dos cultivares, cambios dentro de las células, pero éstos fueron más drásticos en el susceptible, presentando una desorganización general, un incremento en el número de vacuolas y vesículas, así como de retículo endoplásmico. Otras lesiones encontradas fueron rupturas en el sistema de membranas y en la pared celular (Figura 3). En ambos cultivares las alteracio-

nes son semejantes, pero le lleva más tiempo al hongo en desarrollarse sobre el cultivar resistente (SP79-2312). Las observaciones realizadas en todas las repeticiones fueron similares.

La penetración del patógeno tanto por la abertura estomática como por espacios entre las células epidérmicas, coincide con lo señalado por otros investigadores [3]. La detección de hifas infectivas en los tejidos corrobora que bajo las condiciones empleadas de temperatura (31 °C) y humedad relativa (80%) se producen estas estructuras directamente de las esporas y no los esporidios, que es otra forma de infectar los tejidos, pero se producen cuando la temperatura está entre 20 y 25 °C, como se plantea en la literatura [7,18].

Las alteraciones encontradas en la estructura celular de las yemas de caña de azúcar, provocadas por *U. scitaminea*, se traduce en cambios en los órganos y la planta, en general. Las alteraciones en la estructura y en la función de las células, llamados cambios citopatológicos [14], encontradas en este sistema, han sido descritas en otros tipos de vegetales afectados por patógenos de origen fúngico. Por ejemplo, la granulación que se forma en el protoplasto puede ser debida a toxinas del hongo, así como a la penetración del propio microorganismo dentro del hospedero [19]. También se ha señalado que los patógenos pueden incrementar el número y actividad del retículo endoplásmico y de otros orgánulos en las células infectadas [15]. Estas membranas son altamente sensibles

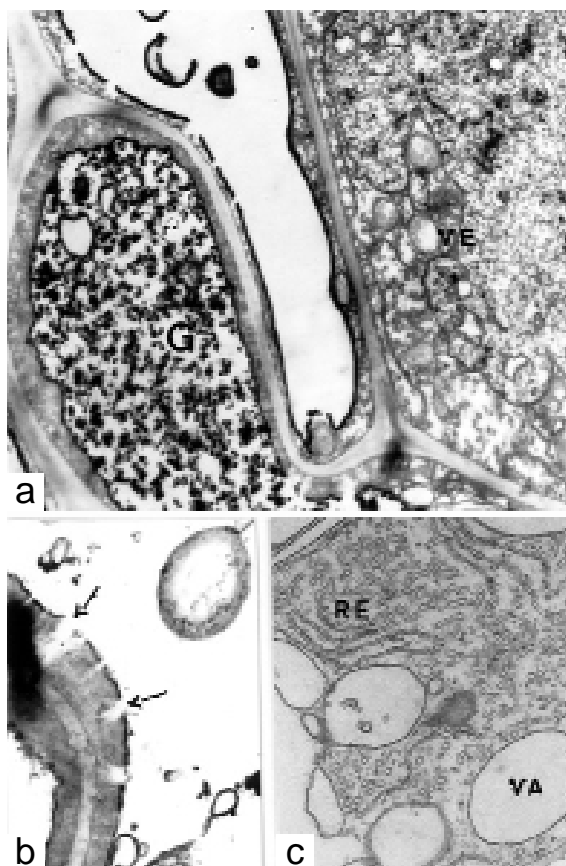


Figura 3. Cambios ultraestructurales que se producen en las células de las yemas del cultivar susceptible de caña de azúcar (NA56-79) al ser infectadas por *U. scitaminea*; a. Incremento de gránulos electrodenso (G) y vesículas (VE) (6.000x); b. Rupturas en la membrana y pared celular (flechas) (14.000x); c. Incremento de cisternas y vesículas del retículo endoplásmico (RE), y vacuolas (VA) (10.000x).

a la acción de los patógenos, sobre todo hongos, ya que se ha descrito el efecto de toxinas de éstos sobre sistemas de membranas en células de trigo. También se han observado alteraciones en plasmalemas y tonoplastos en cebada afectada por diferentes micosis. Cambios semejantes en la ultraestructura celular se han descrito en plantas de maíz infectadas con *Bipolaris maydis* [14].

Los resultados observados ponen de manifiesto que el lento proceso en los cambios estructurales que presentó el cultivar SP79-2312 parece deberse a sus características fisiológicas y bioquímicas, de ahí su resistencia a la enfermedad, pues a pesar de haberse roto la resistencia física por el tipo de inoculación empleada, el hongo no coloniza con facilidad los tejidos de este cultivar. Estudios realizados con las poliaminas y fenoles corroboran la reacción que desarrolla la caña de azúcar ante la infección con *U. scitaminea*, incrementando la concentración de estos compuestos [4,5]. Es conocido que los fenoles están relacionados con los mecanismos de defensa que desarrollan los vegetales frente a parásitos y patógenos [20].

Todo este proceso es altamente complejo, por lo que son muy importantes los estudios celulares de las fitopatologías, para llegar a conocer mejor el mecanismo de degradación que sufren los tejidos durante la interacción hospedante-patógeno.

Bibliografía

- China A, Rodríguez E. Enfermedades de la caña de azúcar. La Habana, Ed. Imago, 1994.
- González R. Bases para el control del carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea* Sydow). Tesis defendida en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto Superior de Ciencias Agrícolas de La Habana, 1998.
- Appezato B, Capote MC, Amarin L. Structural characteristics of buds of sugarcane cultivars with different levels for resistance to smut. *J Plant Diseases and Protection* 1995; 102: 502-508.
- Legaz ME, Armas R, Piñón D, Vicente C. Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *J Exp Bot* 1998; 49: 1723-1728.
- Piñón D, Armas R, Vicente C, Legaz ME. Role of polyamines in the infection of sugarcane buds by *Ustilago scitaminea* spores. *Plant Physiol Biochem* 1999; 1: 57-64.
- Martínez M, Medina I, Naranjo S, et al. Efectos del carbón en la composición química y el contenido de sacarosa en variedades susceptibles y resistentes. *Int Sugar J* 1999; 101: 1211-1221.
- Schenck S. Molecular aspects of the sugarcane smut disease pathogen, *Ustilago scitaminea*. En: Rao GP, Bergamin FA, Margarie RC, Autrey LJC (Eds.) Sugarcane pathology: fungal diseases. New York-London, Elsevier, 1999: 131-140.
- Muñiz Y. Desarrollo de un método molecular validado para el diagnóstico de *Ustilago scitaminea* Syd. en Cuba. Tesis en opción al Título Académico de Maestro en Ciencia en Microbiología. Universidad de La Habana, 2001.
- Acevedo R, Piñón D. Diagnóstico del carbón de la caña de azúcar por inmunofluorescencia indirecta. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13: 8-9.
- Acevedo R, Piñón D. Biological model of sugarcane-mosaic virus interaction. *Current Trends in Sugarcane Pathology* 1994; 16: 227-288.
- Tamayo M. Relación entre la concentración de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xili* y algunos componentes del rendimiento. IV Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, Cuba 2001: 247.
- La O M, López R, León O, Rodríguez E. Mecanismos de defensa bioquímicos en la interacción caña de azúcar - *Ustilago scitaminea*. 41st Annual Meeting of American Phytopathological Society, Cuba 2001: 115.
- Avers CJ. Biología Celular. Mexico DF, Grupo Editorial Iberoamérica, 1991.
- Plant cytopathology. En: Suité DD, Sinclair JB (Eds.) Anatomy and physiology of diseased plants. Boca Katón, CRC Press, 1991: 1-264.
- Cooper MR. Pathogen-induced changes in host ultrastructure. En: Staples CR, Toenniessen HD (Eds.) Plant Disease Control. New York, Elsevier, 1981: 89-105.
- Spurr AR. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruc Res* 1969; 26: 31-43.
- Megías L, Renau J. Técnicas generales. En: Renau J, Megías L (Eds.). Manual de técnicas de microscopía electrónica (MTE). Granada, Universidad de Granada, 1998: 1-19.
- Tóffano BW. Estudos sobre polaridade sexual e possíveis raças fisiológicas de *Ustilago scitaminea* Syd., no estado de Sao Paulo. *Arq Inst Biol Sao Paulo* 1976; 43: 65-79.
- Wheeler HE. Permeability alteration in diseased plants. En: Heitefuss R, Williams PH (Eds.) Physiological Plant Pathology. Berlin, Springer-Verlag, 1976: 236-413.
- Benhamou N, Rey P, Cherif M, Hockenull J, Tirilly Y. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 1999; 87: 108-122.