



Avances en la investigación de la relación patógeno-hospedante y de la resistencia genética a enfermedades de la caña de azúcar en Argentina

J. A. Mariotti¹, C. R. Machado Assefh², G. Rech², P. D. Fontana¹,
N. G. Collavino², M. I. Pocovi², A. M. Rago¹, M. E. Daz²

¹ INTA, ²Facultad de Ciencias Naturales, U. N. Salta
Avda. Bolivia 5150, Salta

jamariotti@gmail.com

ABSTRACT

The paper presents recent progress in the investigation of variability and genetic resistance in relation to Rust and Red stripe diseases of sugar cane in Argentina. Experimental results for rust inoculation under controlled conditions served to postulate that both basal peroxidase activity and its rate of increase after inoculation with the disease could be complementary mechanisms in the expression of resistance in different cultivars. Molecular diversity of rust populations collected in the field in North West Argentina were also investigated based on 538 AFLP markers. Samples collected in different varieties and sites indicated that rust uredospores populations correspond with a single mixed undifferentiated population with a high degree of intrinsic genetic variability. In regard to Red stripe it was possible to optimize an effective procedure for the isolation, identification and genetic characterization of the disease agent. Results permitted for the first time the identification of *Acidovorax avenae* as the agent responsible for the disease in Argentina. The profile analysis for REP-PC and RAPD indicated the presence of at least four different biotypes of the disease in Salta and Tucumán. The occurrence of genetic diversity among isolates permits the design of strategies for the control of the disease by means of resistant varieties.

Key words: genetic resistance, genetic diversity, molecular markers, sugar cane

RESUMEN

Esta contribución presenta avances en la investigación de la variabilidad y resistencia genética con relación a “Roya marrón” y “Estría roja” de la caña de azúcar en Argentina. Resultados experimentales de la inoculación con roya en condiciones controladas permitieron postular que tanto la actividad peroxidasa basal como la tasa de su crecimiento con posterioridad a la infección serían mecanismos complementarios que favorecen la expresión de la resistencia a la enfermedad. También se investigó la diversidad molecular en poblaciones de roya con base en 538 marcadores AFLP a partir de muestreos en diferentes variedades y en una amplia faja de distribución de la enfermedad en el NOA. No se detectaron estructuras genéticas diferenciadas según orígenes, comportándose las diferentes poblaciones como una única gran población indiferenciada de uredosporos con alto grado de variabilidad genética intrínseca. Con relación a Estría roja se logró optimizar una técnica efectiva para el aislamiento, identificación y caracterización genética del agente responsable de la enfermedad. Los resultados obtenidos permitieron confirmar que *Acidovorax avenae* es el agente responsable de estría roja de la caña de azúcar en Argentina, siendo ésta la primera caracterización realizada en la región cañera para esta patología. Por otra parte el análisis de perfiles de REP-PCR y RAPD confirmó la presencia de al menos cuatro biotipos de la enfermedad en aislados de Salta y Tucumán. La existencia de diversidad genética entre aislamientos permite diseñar estrategias de control mediante el uso de variedades resistentes.

Palabras clave: resistencia genética, diversidad genética, marcadores moleculares, caña de azúcar

El cultivo de la caña de azúcar ocupa en la Argentina una superficie de aproximadamente 330.000ha que sustenta una producción anual de 2,3 millones de toneladas métricas. Constituye una actividad estratégica para las principales provincias productoras (Tucumán, Jujuy y Salta) por su fuerte impacto en la económico y social en la región.

La competitividad de la agroindustria de la caña de azúcar se fundamenta en una producción eficiente y estable en el tiempo. Estas características están definidas a su vez por la eficacia de las tecnologías disponibles.

La base genética de la producción, es decir, la disponibilidad de variedades con alto potencial de rendimiento a campo y con aptitud fabril, es uno de los factores más decisivos y determinantes de la competitividad. La seguridad y estabilidad productiva de dichas variedades a su vez, está determinada por su adaptabilidad a las condiciones de cultivo en el subtropical y por las resistencias a factores incidentes bióticos y abióticos (Mariotti, *et al.*, 2006).

Por este motivo los programas de mejora enfatizan en sus objetivos la introducción de resistencias genéticas a las principales enfermedades incidentes, mientras que intentan además profundizar en el conocimiento y comprensión de los mecanismos de las relaciones huésped-hospedero, como base para su control y manejo integrado en condiciones de cultivo.

Nuestro grupo de trabajo inició recientemente una línea de investigación dirigida a mejorar la comprensión de estas relaciones y comportamientos, incorporando a los métodos clásicos nuevas herramientas bioquímicas y moleculares. Esta contribución pretende presentar algunos de los principales avances alcanzados recientemente con relación a dos enfermedades consideradas críticas en Argentina: la “Roya marrón”, producida por *Puccinia melanocephala* H&P Sydow y la “Estría roja” producida por *Acidovorax avenae* (Manns) Willems, *et al.* (1992), Schaad, *et al.* (2008). Ambas enfermedades inducen daños significativos que afectan a la productividad y a la calidad industrial de la caña de azúcar, a la vez que sostienen mecanismos complejos de interacción patógeno-hospedante.

ACTIVIDAD PEROXIDASA: una evaluación bioquímica para evaluar la resistencia a la “roya marrón” de la caña de azúcar

La “Roya marrón” o “común” de la caña de azúcar es una enfermedad foliar fúngica causada por *Puccinia melanocephala*, de gran importancia e impacto económico sobre la producción en casi todo el mundo. Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad varían del 10 al 50% según condiciones y susceptibilidad de los cultivos (Hoy y Hollier, 2006). La evaluación de la resistencia de los materiales fitotécnicos se basa en observaciones a campo y en el uso de escalas valorativas del daño foliar. Esta metodología presenta dificultades en su aplicación en razón de ser altamente dependiente de condiciones ambientales y del grado de subjetividad del evaluador (Asnaghi, *et al.*, 2004, Ramos Leal, *et al.*, 1989).

Por otra parte, se ha demostrado que las peroxidases en las plantas, participan en varios procesos fisiológicos asociados a los mecanismos defensivos a los factores externos incidentes, tanto bióticos como abióticos, VanLoon, *et al.* (2006). El objetivo de estos trabajos fue el de relacionar la resistencia o susceptibilidad a la Roya marrón en variedades contrastantes en su comportamiento con la actividad peroxidasa basal y los cambios inducidos en ésta con posterioridad a la inoculación controlada.

Previamente, debieron caracterizarse los patrones de actividad específica para las peroxidases de la caña de azúcar, con la finalidad de determinar condiciones óptimas para su evaluación en lo que respecta a temperatura, pH, concentraciones óptimas de sustratos y enzimas así como su estabilidad en el tiempo. Se utilizaron dos variedades fuertemente contrastantes respecto de su susceptibilidad: c.v R570 (altamente resistente a la roya) y c.v. NA 86-2280 (altamente susceptible).

La actividad peroxidasa fue evaluada por medio del test de guayacol con modificaciones, tanto en plantas inoculadas y sus respectivos testigos en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz en una cámara de cría. (Colowick y Kaplan, 1957, Johnson y Cunningham, 1971) Estas evaluaciones fueron realizadas a las 24, 48, 72 y 120 horas después de la inoculación.

Se encontraron diferencias en la actividad pe-

roxidasa entre los cultivares y entre las plantas inoculadas y no inoculadas (Tabla I). El c.v. resistente R570 mostró una mayor actividad enzimática en todas las variantes experimentales en comparación con el cultivar susceptible. Por otra parte, la actividad peroxidasa se incremento después de la inoculación con el patógeno en ambos cultivares, pero este incremento fue más rápido y a una mayor tasa en el caso de R570.

Como resultado de estos experimentos se postula que tanto la actividad peroxidasa basal como la tasa de su crecimiento con posterioridad a la infección serían mecanismos complementarios que favorecen la resistencia a la Roya marrón de la caña de azúcar. La simplicidad y reproducibilidad de los procedimientos utilizados permitirían a los programas de mejora genética contar con un procedimiento alternativo objetivo y eficaz para la detección de genotipos resistentes.

Horas después de la inoculación	24 hs	48 hs	72 hs	120 hs	Total
Variedades					
Na 86-2280	1.25 ^a	2.84 ^a	2.78 ^a	3.15 ^a	2.50 ^a
R 570	2.10 ^a	3.63 ^a	3.92 ^b	3.32 ^a	3.24 ^b
Tratamiento de Inoculación					
Plantas Control	1.54 ^a	2.53 ^a	2.56 ^a	2.53 ^a	2.20 ^a
Plantas Inoculadas	1.81 ^a	3.95 ^b	4.14 ^b	3.95 ^b	3.55 ^b
Total	1.67 ^a	3.23 ^b	3.35 ^b	3.24 ^b	

Tabla I. Actividad peroxidasa en caña de azúcar. Medias (en unidades de actividad específica) y significación (*) de las diferencias entre variedades y tratamientos de inoculación a diferentes horas después de inoculadas.

(*) Letras idénticas indican no significación de las diferencias, mientras que letras diferentes indican significación a nivel estadístico del 5%.

La diversidad molecular en poblaciones de *Puccinia melanocephala* y su relación con variedad hospedante y origen geográfico

El objetivo de esta investigación fue la cuantificación de la variabilidad genética y la definición de la estructura poblacional de *Puccinia melanocephala* a partir de recolecciones de esporas en una amplia franja de distribución de la enfermedad en el NOA. La diversidad molecular se utilizó también como base para establecer su posible asociación con diferentes cultivares hospedantes y con la distribu-

ción geográfica de la enfermedad.

Compuestos de uredosporas de roya recolectadas en condiciones de campo fueron identificados según localidad de origen y cultivares hospedantes. La extracción de ADN a partir de las mismas se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Villareal *et al.* (2002) CTAB modificado. Se utilizaron las técnicas de AFLP para el análisis molecular de la variabilidad genética y para determinar la estructura poblacional. Un total de 538 marcadores AFLP fueron generados a partir de combinaciones entre 20 cebadores con la finalidad de realizar el análisis genético poblacional.

Para determinar la variabilidad genética se utilizó el porcentaje de polimorfismo (*P*) para cada población. Las similitudes genéticas se basaron en el coeficiente de Jaccard (*GSj*) utilizando el software FAMD (Schlüter and Harris, 2006). La estructura genética de las poblaciones de roya fue investigada mediante un análisis molecular de la varianza (AMOVA) según Peakall y Smouse 2006.

El polimorfismo detectado fue relativamente alto (85.7%) considerando que *P. melanocephala* presenta únicamente el ciclo asexual en la Argentina. Se efectuaron dos análisis para realizar las comparaciones *entre y dentro* de regiones geográficas identificadas. El análisis de conglomerados (UPGMA) y de Coordenadas principales (PCoA) agruparon poblaciones de diferente origen y provenientes de distintos hospedantes, lo que sugiere que ni el origen geográfico ni los cultivares son determinantes de las relaciones inter poblacionales (Figura 1). Este hallazgo fue corroborado por la falta de significación de la correlación encontrada entre distancias genéticas y distancias geográficas ($\Phi_{IT} = 0.026$; $P = 0.285$). Las diferencias no significativas encontradas entre las poblaciones de roya recolectadas en diferentes variedades ($\Phi_{IT} = 0.026$; $P = 0.06$) también refuerza esta conclusión. Por otra parte los resultados de los análisis AMOVA atribuyen la mayor parte de la variabilidad encontrada (cerca del 95%) a las diferencias que ocurren dentro de las mismas poblaciones (Tabla II A-B). Como consecuencia no se pueden detectar estructuras genéticas diferenciadas, comportándose las diferentes poblaciones como una gran población indiferenciada de uredosporas con alto grado de variabilidad genética intrínseca.

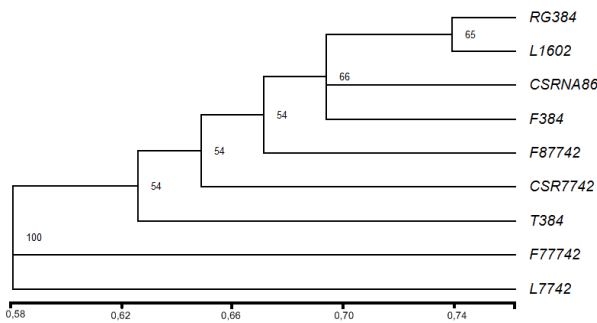


Figura I. Árbol de consenso generado en base del coeficiente de similitud de Jaccard. Los números en los diferentes nodos corresponden con valores de confianza superiores al 50% en un análisis "bootstrap" con 1.000 repeticiones. Los rótulos corresponden con la identificación de muestras extraídas de diferentes localidades y variedades.

A. AMOVA entre Regiones, Poblaciones y dentro de Poblaciones

Fuente de la Variación	gl	Variación (%)
Entre Regiones	2	0%
Entre Poblaciones	6	5%
Dentro de Poblaciones	21	95%
Total	29	100%

B. AMOVA entre y dentro de Variedades hospederas

Fuente de la Variación	gl	Variación (%)
Entre Variedades	3	3%
Dentro de Variedades	26	97%
Total	29	100%

Tabla II. Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) entre y dentro de Regiones, Poblaciones y Variedades hospederas

“Estría roja” de la caña de azúcar: diagnóstico y tipificación de cepas recolectadas en el NOA (*)

La estría roja, conocida también como “polvillo”, es una enfermedad bacteriana que en los últimos años ha adquirido mayor relevancia en todas las zonas cañeras de Argentina. El microorganismo causal ha sido identificado como *Acidovorax avenae subsp. avenae* (Willems *et al.*, 1992) y reclasificado recientemente, elevándolo a la categoría de

especie como *Acidovorax avenae* (Schaad, *et al.*, 2008). Los síntomas se manifiestan como estrías rojas alargadas en las hojas o como podredumbre del tallo que se inicia en el brote apical, o de ambos modos simultáneamente. La importancia que adquirió esta enfermedad radica en la pérdida de tallos molibles en lotes de producción, habiéndose registrado incidencias de hasta 30%, con disminución de la producción a campo, afectando también la calidad de los jugos. Por otro lado la elevada presión de inóculo en los sitios de selección determina el rechazo de clones avanzados y sobresalientes de los programas de mejoramiento genético afectando su eficiencia.

El objetivo del trabajo fue optimizar una técnica efectiva para el aislamiento, la identificación y caracterización genética del agente responsable de la enfermedad. Para ello se realizó un muestreo representativo de hojas de caña de azúcar con síntomas de estría roja en diferentes zonas cañeras de las provincias del NOA, desde donde se obtuvieron aislados de la bacteria para las posteriores determinaciones. Para la identificación y caracterización preliminar se emplearon técnicas de microbiología clásica. En el análisis molecular se aplicó la técnica de PCR empleando los cebadores específicos descritos para esta especie (Song, *et al.*, 2003) y otras técnicas moleculares (REP-PCR, RAPD y ARDRA) que permitieron realizar una estimación de la diversidad genética existente entre los distintos aislamientos. Para el desarrollo de estas técnicas se aplicaron los protocolos y las condiciones descritas por Silva, 2005 y Fontana *et al.*, (2005) Tanto la identificación fenotípica, como así también la caracterización molecular, brindaron datos contundentes para la confirmación de la identidad de esta especie coincidiendo con las características ya descritas para la misma (Jones *et al.*, 2001).

La identidad de la especie fue además confirmada mediante el análisis de la secuencia del producto obtenido en la PCR especie-específica y en la amplificación del gen ARNr 16S, por comparación con secuencias de *Acidovorax* depositadas en la base de datos de *GenBank*. Por otro lado, las pruebas de patogenicidad realizadas con los aislamientos de *Acidovorax* resultaron positivas pudiendo reproducir exitosamente los síntomas de la enfermedad en plántulas de caña de azúcar inoculadas.

El análisis de los perfiles de REP-PCR y RAPD

confirmó la presencia de al menos cuatro biotipos entre los aislamientos analizados, con lo cual podemos estimar que existe una variabilidad genética real entre los aislados de Salta y Tucumán. El análisis de ARDRA empleando diferentes enzimas de restricción, no mostró poder discriminatorio dentro de las cepas evaluadas, pero sí para distinguir la especie en estudio respecto de especies bacterianas epifitas presentes en las muestras analizadas que pueden tomarse como falsos positivos por la similitud de las colonias. Algunas de las enzimas evaluadas en esta técnica fueron: *TaqI*, *HaeIII*, *Hinfl* y *HincII*, de las cuales las dos primeras fueron las que mostraron los perfiles más diferenciales.

La existencia de diversidad genética entre los aislamientos resulta una información importante para diseñar estrategias de control mediante el uso de variedades resistentes, orientando los programas de mejoramiento genético hacia la obtención de variedades que evidencien elevada tolerancia a las cepas predominantes.

Los resultados obtenidos permitieron confirmar que *Acidovorax avenae* es el agente responsable de estría roja de la caña de azúcar en Argentina, siendo ésta la primera caracterización realizada en la región cañera para esta patología.

(*) La información presentada en esta sección corresponde a parte de una Tesis presentada a la Universidad Nacional de Córdoba por P. D. Fontana (2010).

BIBLIOGRAFÍA

- Asnaghi, C.; Roques, D.; Ruffel, S.; Kaye, C.; Hoarau, J. Y.; Télismart, H.; Girard, J. C.; Raboin, L. M.; Risterucci, A. M.; Grivet, A.; D'Hont, A. (2004). Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Bru1*) using bulked segregant analysis and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108:759-764.
- Colowick, P. and Kaplan, J. (1957). The Guaiacol Test. *Methods in Enzymology* 2, 769-817
- Fontana C.A., Coconcelli P.S., y Vignolo G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Inter. Journal of Food Microbiolog.* 103:131-142.
- Johnson, L.B.; Cunningham, B.A. (1972). Peroxidase activity in healthy and leaf-rust-infected wheat leaves. *Phytochemistry* 11: 547-551.
- Jones J.B., Gitaitis R., y Schaad N. (2001). *Acidovorax and Xylophilus*. En: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Ed. Schaad N., Jones J.B. and Chun W. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN. pp. 121-137
- Mariotti J. A., Sopena R. A., Ullivarri E., Rago A. M., Terán C. H., Collavino N. G., Pocovi M. I. y G. E. Simon (2006) Breeding and sustainable crop management as the basis for competitiveness of sugar cane production in Argentina. Proc. Int. Symposium IS.2006, 239-245, Guilin, P. R. China
- Peakall R, Smouse PE, (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6. pp:288-295.
- Ramos Leal, M.; Ruiz, A.; Sandoval, I.; Maribona, R.H. (1989). Biochemical Evaluation of Fungal Disease Resistance in Sugarcane. *Plant Breeding* 102: 45-50.
- Rott P., y Davis M.J. (2000). Red Stripe (Top rot). In: A guide to sugarcane diseases. Montpellier: Cirad Publications Service, p.60-62.
- Silva M.S. (2005). Caracterização serologica, molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineas* (Ashby) Dowson agente causal da escaldadura da cana-de-açúcar. Tesis Magister. Universidade de São Paulo, Brasil, 61pp.
- Song W.Y., Sechler, A.J., Hatziloukas, E., Kim, H.M. y Schaad, N.W. (2003). Use of PCR for rapid identification of *Acidovorax avenae* and *A. avenae* subsp. *citrulli*. En: N.S. Iacobellis, et al. (Eds.), *Pseudomonas syringae and related pathogens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.531-544.
- Schaad N.W., Postnikova E., Sechler A., Claffin L., Vidaver A., Jones J.B., Agarkova I., Ignatov A., Dickstein E., Ramundo B. (2008). Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. cotrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Syst. And Appl Microb.* 31: 434-446.
- Schlüter P.H., Harris S.A. (2006). Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology. Notes* 6, 569-572.

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ.(2006). Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phyto-pathology* 44, 135–162

Villareal LMMA, Lannou C., Vallavieille-Pope C. y Nee-
ma C., (2002). Variabilidad genética en poblaciones
muestreadas a escala local de *Puccinia striiformis* f.
sp tritici durante epidemias naturales. *Applied and
Environmental Microbiology* 68, 6138-6145.

Willems A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kers-
ters, K., and De Ley, J. (1992), Transfer of several
phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovo-
rax* as *Acidovorax avenae* subsp. nov., comb. nov.,
Acidovorax avenae subsp. *citrulli*, *Acidovorax ave-
nae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J.
Syst. Bacteriol.* 42: 107-119.

- Received **30/07/2010**

- Accepted **29/08/2011**