

Comunicación Corta

RELACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS VASOS DEL XILEMA Y LA PRESENCIA DE *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Aleika Iglesia*, Esther Lilia Peralta, Elba Alvarez*, J. Milián*** y Madyu Matos******

*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: aiglesia@censa.edu.cu; **Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT) Ciudad de La Habana, Cuba, ***Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN: Se evalúa la relación existente entre la funcionalidad de los haces del xilema y su colonización por la bacteria. Para ello se utilizan los métodos de tinción de haces funcionales (STM) y la inmunopresión de tejidos (TBEIA), respectivamente. Las variedades que presentaron una colonización bacteriana severa, también tuvieron mayores porcentajes de vasos no funcionales. Se reveló una alta correspondencia ($R^2 = 0.92$), lo que permitió afirmar que existe una estrecha relación entre la no funcionalidad de los vasos del xilema y la presencia de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, por lo que la tinción de haces funcionales pudiera ser utilizada para evaluar el comportamiento varietal frente a la enfermedad (Palabras clave): *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; raquitismo de los retoños; inmunopresión de tejidos; identificación

RELATIONSHIP OF THE FUNCTIONALITY OF XYLEM BUNDLES AND THE PRESENCE OF *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

ABSTRACT: The existent relationship between the functional bundles and their colonization by the bacterium was evaluated. The methods Tissue blot enzyme immunoassay (TBEIA) and stain transpiration were the methods used (STM). The varieties that presented a more severe bacterial colonization had also higher percentages of non-functional bundles. There was a high correspondence ($R^2 = 0.92$), which allowed to affirm that there was a close relationship between the non-functionality of the xylem bundles and the presence of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. The STM could be used in order to evaluate the varietal resistance against the disease.

(Key words: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; ratoon stunting disease; TBEIA, identification)

Entre las patologías que más afectan el cultivo de la caña de azúcar se encuentra el raquitismo de los retoños de la caña de azúcar producida por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* y presente en nuestro país desde 1953. En la actualidad se considera una de las más importantes por los altos niveles de incidencia y propagación, así como las considerables pérdidas en los rendimientos que ha causado durante los últimos años (5).

El control de esta enfermedad se ha dificultado debido a la facilidad de transmisión mecánica que

ocurre durante las operaciones de plantación y cosecha, en función del alto grado de infectividad que posee el material que se utiliza para la siembra y el contenido de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (3, 16).

La experiencia internacional (2, 7, 8, 10) y los resultados obtenidos en Cuba (5, 6, 11), sugieren que el organismo causal de esta enfermedad mantiene una estrecha adaptación a los tejidos del xilema y afecta a una gran cantidad de genotipos independientemente de su procedencia genética y geográfica, por lo que se han presentado dificultades para encontrar

variedades resistentes al ataque de este patógeno y una limitada existencia de fuentes de resistencia frente a la enfermedad.

Estas dificultades unidas a las presentadas en el diagnóstico de campo, la complejidad de la bacteria dada por su naturaleza fastidiosa, así como su alta distribución en las plantaciones cañeras, ha conllevado a que las evaluaciones de esta enfermedad resulten engorrosas y frecuentemente contradictorias y aunque el método de inmunopresión (TBEIA) ha sido sugerido por sus ventajas en cuanto a su nivel de detectabilidad no se conoce la correlación existente entre la enfermedad, la presencia bacteriana y la funcionalidad de los haces del xilema (14).

Es por ello que este trabajo tiene como objetivo determinar la relación existente entre la no funcionalidad de los vasos del xilema y la presencia de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* para posteriormente valorar la factibilidad del uso de la tinción de haces vasculares en la evaluación del comportamiento varietal frente a la enfermedad en Cuba.

Se realizó un experimento en la Estación Experimental "Antonio Mesa" de Jovellanos, Matanzas. Se plantaron tres surcos para cada una de las variantes (infectadas y saneadas) y se utilizaron cinco variedades de caña de azúcar con diferente grado de resistencia frente a la enfermedad: resistente (My5514); intermedias (C111-79, C323-68) y susceptibles (C120-78, CP31-294) (4,16). Estas variedades fueron mantenidas en invernaderos con temperatura y riego controlado.

A los 10 meses después de plantados los propágulos se extrajeron 10 tallos por cada surco que se corresponden con plantones diferentes para evaluar la funcionalidad de los vasos del xilema mediante el procedimiento de tinción de los haces funcionales (STM) (2).

Para realizar la evaluación del material se preparó una solución alcohólica de safranina (2.25% p:v), diluida 1:10 para su utilización. Esta dilución se distribuyó a razón de tres litros por cada caja plástica, en las que se colocaron 30 tallos de cada variedad (10 por surco), cortados próximos al nivel del suelo, en los que se mantuvieron las hojas fisiológicamente activas. Pasada una hora se retiraron los tallos y se extrajeron pequeños cilindros de 10mm de diámetro, que se dejaron secar a temperatura ambiente. Estos se observaron al estereomicroscopio para el conteo de los haces funcionales y no funcionales, los cuales fueron identificados por la presencia o ausencia de una coloración rosada respectivamente. Con estos resultados se calculó el porcentaje de vasos funcionales (VF) y no funcionales (VNF).

Las mismas muestras fueron evaluadas mediante el método de TBEIA (1). Para ello, se extrajeron pequeños cilindros de 10mm de diámetro y 10mm de altura del tercio inferior (10 por réplica), los que fueron centrifugados en placas a 3 000 rpm durante 15 minutos (10), para lograr la deposición sobre la membrana de nitrocelulosa de las células contenidas en los haces vasculares. Se realizó su fijación a 80°C durante 1 hora. El resto del procedimiento fue ejecutado de acuerdo a lo establecido para la prueba serológica del Dot-Blot (12).

Para el revelado, se preparó la solución sustrato con 30mg de fosfato-naftol y 5mL de N,N-dimetilformamida, en 100 mL de tampón Tris 0.2M a pH 9.1. Para colorear 100 cm² de membrana de nitrocelulosa se preparó inmediatamente la solución sustrato de trabajo adicionando 0.1g de azul rápido y 0.5mL de solución de MgCl₂ a 0.1M en 100 mL de solución sustrato. Las membranas se incubaron durante 20-30 minutos hasta la aparición de manchas azules en los lugares donde se depositaron las células de los haces vasculares. Posteriormente se lavaron con hipoclorito de sodio al 1%, seguido de un lavado con agua corriente. Después del secado a temperatura ambiente, se procedió al conteo de los haces colonizados por la bacteria (VC) bajo un microscopio estereoscópico.

Los datos obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante un análisis de varianza simple (paquete de programas SAS, versión 8.02) y las medias fueron comparadas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. Los porcentajes determinados fueron transformados según $\arcsen\sqrt{x/100}$. Se realizó un análisis de regresión para establecer la relación existente entre la no funcionalidad de los haces con la colonización de los mismos por la bacteria.

RESULTADOS

En los resultados de la aplicación del método de STM en plantas infectadas y saneadas, se pudo apreciar que resulta fácil establecer diferencias entre plantas enfermas y sanas o aquellas menos afectadas por la enfermedad.

Se puede observar que las variedades que soportaron una colonización bacteriana más severa (C120-78, CP31-294) también presentaron mayores porcentajes de vasos no funcionales (VNF) (Tabla 1).

La correspondencia entre la presencia bacteriana y la no funcionalidad de los vasos se comprobó mediante los análisis de regresión realizados, que revelaron una alta correspondencia ($R^2 = 0.92$) entre la

TABLA 1. Porcentajes de vasos no funcionales y colonizados por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*./ *Percentages of non-functional bundles and colonized by Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Variedad	% Vasos no funcionales (VNF)	% Vasos colonizados (VC)
C120-78	76	75
CP31-294	68	70
C323-68	38	35
C111-79	33	16
My5514	6	1

media de los VC y los correspondientes a los VNF, lo que permitió afirmar que existe una estrecha relación entre la funcionalidad de los vasos del xilema y la presencia de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, evidenciada mediante TBEIA (Figura 1).

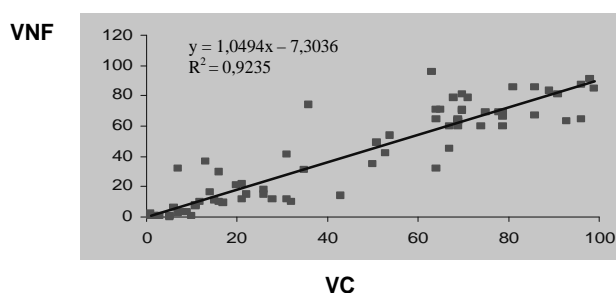


FIGURA 1: Relación existente entre la no funcionalidad de los haces y la presencia bacteriana/ *Relationship between non-functional bundles and the bacterial presence.*

Estos resultados presentan similitud con los obtenidos al evaluar el comportamiento de diferentes genotipos susceptibles, los cuales soportaron una alta colonización de sus vasos. De igual forma están relacionados con los de otros autores quienes han señalado que la resistencia de variedades de caña a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* está asociada con la baja tasa de colonización de los tallos (1, 9, 10).

Tales resultados pueden vincularse con los obtenidos recientemente (15), quienes han sugerido además, que la funcionalidad de los vasos está relacionada con la efectividad del diagnóstico por métodos inmunoquímicos y moleculares, los cuales demostraron que sólo cuando existen menos del 50% de los haces funcionales es posible obtener niveles de detección superiores al 95%.

El método de TBEIA ha sido sugerido por varios autores para la evaluación de la resistencia varietal,

pero hasta el momento no se cuenta con referencias que demuestren cuantitativamente la relación de la enfermedad con la concentración bacteriana, generalmente ha sido empleada para eliminar cultivares con altas concentraciones del patógeno en sus haces vasculares. La correspondencia determinada en este trabajo asocia directamente la obstrucción de los haces vasculares con la presencia de la bacteria y la enfermedad, demostrando que puede ser utilizada para evaluaciones del RSD y representa además un modelo interesante para la medición de las alteraciones fisiológicas inducidas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en el hospedante, útil para profundizar en el conocimiento de esta interacción, como complemento de otras tecnologías histológicas, bioquímicas y moleculares (1,10).

REFERENCIAS

1. Benites, P.R. (2004): Evaluación de la resistencia de variedades de caña de azúcar al raquitismo de los retoños en base a la tasa de colonización de los colmos por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Disertación presentada para la obtención del grado de Maestro en Ciencias*. Piracicaba. Estado de Sao Pablo. Brasil. 110 pp.
2. Chagas, P.R.R. (1986): Método de coloração do xilema pela corrente transpiratória aplicado na determinação de infecção do raquitismo da soqueira em viveiros e cana-de-açúcar. Piracicaba. *Disertación en la escuela Superior de Agricultura*. Universidad São Paulo. 123p.
3. China, A. (2002): Panorama fitopatológico de la caña de azúcar en Cuba. En: *Seminario Taller 35 Aniversario del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar*. (Jovellanos, Matanzas). Pp. 67-70.
4. China, A.; López, M. y Gago, S. (1995): Comportamiento varietal de la caña de azúcar ante el raquitismo de las socas (RSD) producido por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. *Revista Caña de azúcar*. 13(01): 23-30.
5. China, A.; Pérez, J. R.; Peralta, E.L. y Matos, M. (2005): Raquitismo de los retoños de la caña de azúcar: Medio siglo de investigaciones en Cuba. En: *Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal*. La Habana, Cuba, mayo 24. Pp. 62.
6. China, A.; Pérez, G.; Prada, F.; Leal, Yanaelis; Matos, Madyú y Pérez, F. (2001): Fuentes de

- resistencia al raquitismo de los retoños de la caña de azúcar. En: *IV Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal*, Varadero, Cuba, 251-252.
7. Davis, M.J. (2005): Advances in Diagnosis and Management of Leaf Scald and Ratoon Stunting Diseases of Sugarcane. En: *Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal*. La Habana, Cuba, mayo 24-28. Memorias AS 3.1.
 8. Davis, M.J.; Vidaver, A.K. (2001): Coryneform plant pathogens. En: *Plant pathogenic bacteria* Schaad, N.W.; Jones, J.B. y Chun, W. (Eds). Chapter: Diseases caused by bacteria. Pp. 218-235.
 9. Giglioti, E.A. (1996): Método conciliado para evaluar el efecto de la colonización de los tallos de caña de azúcar por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Escuela Superior de la Agricultura. Luís Queiroz. Universidad de San Carlos. Brasil. 134p.
 10. Giglioti, E.A.; Comstok, J.C.; Davis, M.J.; Matsuoka, S. y Tokechi, H. (1997): A comparison of staining by transpiration method and tissue blot immunoassay to screen sugarcane genotypes for resistance to ratoon stunting disease. *ISSCT Pathology and Molecular Biology*. Workshop. South Africa. (Abstr.) p 56.
 11. González, R.; Rodríguez, J. y Tamayo, M. (2002): Estrategias para la resistencia a enfermedades de la caña de azúcar. En: *Memorias del VII Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados de la caña*. 200 pp.
 12. Iglesia, Aleika; Peralta, Esther Lilia y Díaz, Maricela (2002): Validación de métodos inmunoquímicos para el diagnóstico de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal del Raquitismo de los Retoños de la Caña de azúcar. *Rev. Protección Veg.* 17(1): 20-24.
 13. Peralta, Esther Lilia; Arocha, Yaima; Iglesia, Aleika; Díaz, Maricela; Álvarez, Elba; López, Mercedes; Pino, Oriela; Miranda, Ileana; Milián, J.; Carvajal, O.; Matos, M. y Curbelo, I. (2003): Completamiento de la caracterización de los patógenos causantes de las enfermedades más importantes de la caña de azúcar en Cuba y desarrollo de métodos de mayor eficacia para su control. *Informe Final de Proyecto*. Academia Nacional de Ciencias de Cuba, 70 p.
 14. Pérez, J.R.; Matos, Madyú y Figueredo, Y. (2001): Estudio de la resistencia de variedades comerciales de caña de azúcar al raquitismo de los retoños empleando STM. 22(2): 54-57.
 15. Steindl, D.R. (1961): Ratoon stunting disease. En: *Sugarcane disease of the World*. Martin, J.P.; Abbott, E.V.; Hughes, C.G. (Eds). Amsterdam: Elsevier. Chapter 1: 433-459.
 16. Taylor, P.W.J. (2004): Detection and control of transmission of ratoon stunting disease. En: *Sugarcane Pathology: Volume III Bacterial and Nematode Diseases*. Rao, G. P. (Ed) Oxford & IBH. Pp. 209-217.

(Recibido 13-4-2006; Aceptado 1-11-2006)