

# ANALISIS ELECTROFISIOLOGICO PARA LA DETECCION DE RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD MANCHA DE OJO DE LA CAÑA DE AZUCAR

E. Niubó, C. Sánchez y M. Ramos Leal.

Dpto. Mejoramiento de Plantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 26 de febrero de 1992.

**RESUMEN.** Se empleó un método electrofisiológico para evaluar en tejido foliar la resistencia a la enfermedad Mancha de Ojo. Se determinaron los cambios del potencial superficial durante la estimulación eléctrica umbral, estudiándose la interacción de la toxina DS con el tejido foliar en variedades susceptibles y resistentes a la enfermedad. El aumento del potencial superficial espontáneo puede reflejar la posible unión de la toxina con la proteína de membrana (con actividad específica de enlace con la toxina DS, y caracterizada por un peso molecular aproximado de 40 KDa y un pH isoelectrónico de 4,6), tanto en las variedades resistentes como en las susceptibles. Además, se encontró una disminución de la variación porcentual del potencial superficial en las variedades susceptibles bajo el efecto de la toxina, mientras que en la resiente no se observó este cambio.

## INTRODUCCION

Es conocido que la toxina producida por el hongo *Drechslera (Helminthosporium) sacchari*, no afecta por igual a todas las variedades de caña de azúcar,<sup>1</sup> desarrollándose en algunas la enfermedad conocida por Mancha de Ojo y en otras o no se manifiesta o las lesiones del tejido son pequeñas. De este comportamiento deriva la clasificación de variedades susceptibles y resistentes a la enfermedad.

Strobel<sup>2</sup> reportó que los efectos sobre la membrana plasmática ocurren a través de la unión de la toxina con una proteína presente en aquella. La unión de la toxina a la proteína parece activar la ATPasa Mg-K de la membrana plasmática de las células de las hojas, alterándose la relación de influjo a eflujo de iones K<sup>+</sup> a través de ella.

La unión de la toxina a las proteínas de membrana, así como un desbalance iónico, puede propiciar variaciones en la polaridad eléctrica de las células.

Teniendo en cuenta la disposición celular del tejido foliar en dipolos eléctricos en serie,<sup>3</sup> los autores se propusieron realizar un estudio del comportamiento del potencial eléctrico superficial en variedades susceptibles y resistentes a la enfermedad bajo el efecto de la toxina, con el objetivo de disponer de una prueba indicadora de resistencia a la enfermedad Mancha de Ojo.

## MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron tres variedades comerciales de la caña de azúcar, de las cuales se conocía su grado de resistencia a la enfermedad: C 20-71 y C 87-51 (altamente susceptibles, pero en diferente grado) y la PR 9-80 (altamente resistente). El tejido elegido fue la hoja +3 (según la clasificación de Kuijper<sup>4</sup>) de plantas de 8 meses.

**ABSTRACT.** An electrophysiological test was used to evaluate in leaf tissue the resistance to eyespot disease. The changes of surface potential during threshold electrical stimulation have been determined studying the interaction between the DS toxin with foliar tissue from susceptible and resistant varieties. The increase of spontaneous surface potential may reflect the possible binding to the toxin with the membrane protein (membrane protein with specific activity of binding to DS toxin, characterized by an approximate molecular weight of 40 KDa and isoelectric pH of 4,6) in the resistant and susceptible varieties. Besides, a decrease of the percentual variation of surface potential was found in susceptible varieties under the effect of toxin, but not in the resistant one.

## Tratamiento con la toxina

Los fragmentos de hojas se incubaron durante 2 h en un filtrado parcialmente purificado de la toxina del hongo *D. sacchari* concentrado 10v eces, según estaba descrito<sup>5</sup>. A continuación se lavaron durante 10mi n con agua corriente y se procedió al registro eléctrico. Como control se realizaron incubaciones en presencia de una solución fisiológica que contenía: KCl 1mmol/L, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1mmol/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,25 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,904 mmol/L y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,048 mmol/L.

Para valorar la actividad de la toxina DS se realizó un análisis conductimétrico, en el cual se midió la estrusión de electrolitos en las hojas sometidas al efecto de la toxina.<sup>5</sup>

## Registro eléctrico

Haciendo modificaciones a la técnica descrita por Bures,<sup>3</sup> se registró el potencial bioeléctrico superficial espontáneo (Pse) en las hojas con dos macroelectrodos de vidrio, que contenían una solución saturada de KCl, dispuestos a una distancia constante entre ellos y conectados a un preamplificador MES 8101 de la Nihon Kohden, con alta impedancia de entrada. Después de hacer el registro del potencial espontáneo, se procedió a medir el potencial inducido por estimulación eléctrica (Psi) mediante la aplicación de pulsos de corriente directa de 2 V, 500 ms de duración y polaridad contraria a la existente en el tejido, siendo manipulados manualmente.

Una vez registrados los potenciales Pse y Psi, se calculó la variación del potencial superficial (DPs) y la variación del potencial de estimulación con respecto al potencial espontáneo (%DPs).

Las comparaciones estadísticas se realizaron en cada variedad con y sin toxina, a través del test de análisis de la varianza (ANOVA de clasificación simple).

A los valores de los cambios porcentuales relativos (%DPs con y sin toxina) entre variedades, se les realizaron las pruebas de normalidad y posteriormente, se les aplicó la prueba de Newman-Keuls para un nivel de significación del 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Como criterio de la actividad biológica de la toxina DS usada, pudo apreciarse un comportamiento altamente específico de dicha fracción tóxica (Tabla I).

Se confirmó igualmente que las variedades responden a la toxina, de forma similar a como lo hacen frente a la infección del patógeno en su conjunto.

El estudio del potencial superficial espontáneo, mostró que las magnitudes de este indicador en el tejido foliar variaba significativamente entre las variedades estudiadas, observándose valores medios de  $(14 \pm 3,9)$  a  $(20 \pm 5,1)$  mV en condiciones normales.

**TABLA I**  
**Variaciones del potencial superficial en hojas de caña de azúcar bajo el efecto de la toxina producida por el hongo *D. sacchari***

Variedad	n	Pse	DPs		%DPs	n	Pse	DPs		%DPs
			Control	Toxina				Control	Toxina	
C 20-71	33	$14 \pm 3,9^a$	74	$8 \pm 12,2^b$	34	$24 \pm 6,1^a$	41	$6 \pm 7,6^b$		
C 87-51	24	$15 \pm 3,9^c$	53	$0 \pm 8,8^d$	27	$21 \pm 8,3^c$	41	$7 \pm 6,0^d$		
PR 9-80	16	$20 \pm 5,1^e$	12	$60 \pm 16,1$	16	$36 \pm 9,7^e$	29	$82 \pm 13,3$		

Valores con letras iguales difieren significativamente.

Strobel reportó<sup>2</sup> que las membranas de las hojas de los clones de la caña de azúcar resistentes a la enfermedad, poseen una proteína de peso molecular y punto isoeléctrico comparable a la de las susceptibles, pero que la toxina se une en menor grado a las primeras.

Ruiz y colaboradores,<sup>6</sup> estudiaron la incorporación de la toxina DS marcada con <sup>14</sup>C, al tejido foliar de variedades de caña con diferentes grados de susceptibilidad a la enfermedad, encontrando que la incorporación de la toxina radioactiva era 20% menor en las variedades resistentes que en las susceptibles.

Las variaciones porcentuales del potencial superficial entre las variedades con y sin toxina, mostraron un tipo de respuesta diferencial (Tabla II). Las dos variedades susceptibles respondían a la estimulación eléctrica en presencia de la toxina, con pequeñas variaciones porcentuales del potencial superficial, difiriendo significativamente de las variaciones observadas en sus controles. Esta respuesta en la variedad resistente (PR 9-80), se diferencia de las variedades susceptibles en que la variación del potencial en presencia y ausencia de la toxina no difieren significativamente, aunque se observó una clara tendencia en PR 9-80a responder con mayores valores ante el estímulo eléctrico en presencia de la toxina. El patrón de respuesta ante el estímulo eléctrico en esta última variedad, pudiera estar relacionado con el grado de unión de la toxina a las proteínas de membrana, coincidiendo con los resultados de Ruiz y colaboradores.<sup>6</sup>

Las diferencias entre los %DPs con y sin toxina (Tabla III), permitió ordenar a las variedades según su grado de resistencia, correspondiéndose la menos resistente, con el valor más negativo y la más resistente, con el más positivo.

La prueba de Newman-Keuls mostró que mediante este índice, es posible separar a estas variedades en tres grupos (Tabla III). En uno se encuentra la variedad patrón de resis-

**TABLA I**  
**Conductividad en hojas incubadas con la toxina producida por el hongo *D. sacchari***

Variedad	Conductividad (μS)
PR 9-80	54,5
C 87-51	109,0
C 20-7	92,0

El tratamiento con la toxina DS por períodos de 2 h se acompañó de aumentos significativos del potencial superficial (Tabla II). La similitud de las respuestas de las tres variedades ante el efecto de la toxina, no permitió discriminar entre variedades susceptibles y resistentes a través de este parámetro eléctrico. Sin embargo, el aumento del potencial superficial espontáneo en presencia de la toxina, en todas las variedades estudiadas, es un claro indicio de que la toxina se ha unido a las membranas celulares, independientemente del grado de resistencia a la enfermedad.

**TABLA II**

**Variaciones del potencial superficial en hojas de caña de azúcar bajo el efecto de la toxina producida por el hongo *D. sacchari***

Variedad	n	Pse	DPs		%DPs	n	Pse	DPs		%DPs
			Control	Toxina				Control	Toxina	
C 20-71	33	$14 \pm 3,9^a$	74	$8 \pm 12,2^b$	34	$24 \pm 6,1^a$	41	$6 \pm 7,6^b$		
C 87-51	24	$15 \pm 3,9^c$	53	$0 \pm 8,8^d$	27	$21 \pm 8,3^c$	41	$7 \pm 6,0^d$		
PR 9-80	16	$20 \pm 5,1^e$	12	$60 \pm 16,1$	16	$36 \pm 9,7^e$	29	$82 \pm 13,3$		

tencia (PR 9-80), en otro la de susceptibilidad (C 20-71) y en el tercero la variedad C 87-51. Esto sugiere que esta prueba electrofisiológica puede ser empleada en la detección de resistencia a la enfermedad Mancha de Ojo en la caña de azúcar.

**Tabla III**  
**Diferencia entre la variación porcentual del potencial superficial**

Variedad	%DPs (T-C)
PR 9-80	23,50a
C 87-51	-12,59 a
C 20-71	-30,03 a

Valores con letras coincidentes difieren entre sí según la prueba de NEWMAN-KEULS ( $p = 0,05\%$ ). %DPs (T-C) diferencia del porcentaje de variación del potencial superficial entre las muestras con toxina y las controles.

Los efectos de la toxina sobre el tejido están relacionados con las perturbaciones provocadas a nivel de membrana, las cuales se expresan como caída del potencial de transmembrana<sup>7,8</sup> activación de la ATPasa K-Mg de la membrana plasmática<sup>9</sup> y fuga de electrolitos.<sup>1,5</sup> Otras toxinas también producidas por hongos, provocan efectos similares en otras especies para las cuales ellos son específicos, reportándose que su efecto primario ocurre sobre la membrana plasmática de la planta huésped.<sup>10-12</sup>

A los efectos anteriormente apuntados se adiciona ahora, según los resultados aquí presentados, la pobre respuesta eléctrica del tejido susceptible bajo el efecto de la toxina ante un estímulo umbral. Es sabido que el potencial dipolo se origina de la orientación de las uniones ésteres o de la interacción de las cabezas de los grupos con el agua en la membrana citoplas-

mática, alterando la orientación de las proteínas de membrana. Estas a su vez, determinan los movimientos de sustancias e iones a través de ella.

Es posible que la unión de la toxina a las proteínas de membrana se oponga, en mayor grado en las variedades susceptibles, al cambio de la polaridad de los dipolos en el área inter polar durante la estimulación, oponiéndose a cambios conformacionales de las proteínas y los movimientos de grupos cargados en la superficie de la membrana.

## CONCLUSIONES

Se estudió la resistencia a la enfermedad Mancha de Ojo en la caña de azúcar mediante un método electrofisiológico.

Se demostró la existencia de variaciones en los potenciales superficiales del tejido foliar bajo el efecto de la toxina producida por el hongo.

Fue posible ordenar a las variedades, según su grado de resistencia mediante los valores calculados del %DPs.

Se recomienda este método en los estudios de resistencia a dicha enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

1. Scheffer R.P. and R.S. Livingston. *Phytopathology*, **70**, 400, 1981
2. Strobel G.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4232, 1974
3. Bures J., M. Petran and J. Zachar. *Electrophysiological Methods in Biological Research*. Czechoslovak Academy of Sciences, 283, 1967.
4. Kuijper H. (Citado por Vandillewijn, Botánica de la caña de azúcar, Edición Revolucionaria, 1975, La Habana, Cuba).
5. Ramos Leal M., Ruiz A., Sandoval I. and Maribona R. *Plant Breeding* 102:45-50, 1989
6. Ruiz A., Ramos Leal M., Rodríguez M. and Maribona R. *Europ. J. Phytopathology* (En publicación).
7. Schroter H. and Novacky A. *Physiol Plant Pathol.*, **26**, 165, 1985
8. Duvick J. P., Dale J. M., Kratky Z., Macko V., Acklin W. and Arigoni D *Plant Physiol.*, **74**, 117, 1984
9. Strobel G.A. *TIBS*. Nov., 1976.
10. Otani H., Tomiyama K., Okamoto H., Nishimura S. and Kohmoto K. *Ann Phytopath Soc. Japan*, **55**, 466, 1989
11. Tabira H., Otani H., Shijimomura N., Kodama M., Kohmoto K. and Nishimura S. *Ann Phytopath Soc. Japan*, **55**, 567, 1989
12. Gardner J.M., Kono Y and Chandler J.L. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **29**, 293, 1986