

Guión de prácticas de la asignatura Fisiopatología Vegetal

Rocío Santiago. Blanca Fontaniella. Carlos Vicente.

Departamento de Biología Vegetal I. Facultad de Biología. Universidad Complutense.

Avenida José Antonio Novais, 2. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. España.

rocsanti@bio.ucm.es cvicente@bio.ucm.es

Resumen: Se propone como objetivo general de estas prácticas el estudio de un caso concreto de interacción entre planta y patógeno. El ejemplo elegido será el carbón de la caña de azúcar. Se estudiarán distintas respuestas que elicitán moléculas de *S. scitamineum* en dos variedades de caña de azúcar, resistente y susceptible, por acumulación de proteínas de resistencia (PR, β -1,3-glucanasas, quitinasas y peroxidasas), fenoles solubles y refuerzo de la lignificación en el esclerénquima y el xilema. Además se pretende comprobar el efecto aglutinante de las glicoproteínas de caña sobre teliosporas del carbón.

Palabras clave: *Sporisorium scitamineum*. *Saccharum officinarum*. Proteínas relacionadas con patogénesis (PRP). Fenoles. Lignificación. Glicoproteínas.

INTRODUCCIÓN

De las diferentes enfermedades de la caña de azúcar, el carbón es una de las principales en la mayoría de las áreas productoras del mundo, teniendo especial repercusión por las pérdidas económicas que supone. El carbón afecta al crecimiento vegetativo y a la calidad del jugo, disminuyendo el rendimiento de las cosechas en un 20-30%. El síntoma característico de las plantas infectadas, en la etapa más avanzada de la patología, es la formación de un soro denominado "látigo" (Fig.1), en el que se agrupan las teliosporas de resistencia que serán dispersadas por el viento.

La formación de esta estructura reproductora en el extremo apical del tallo implica su destrucción y por tanto impide el crecimiento de la planta.

La forma más efectiva que existe para el control de la enfermedad radica tanto en el uso de variedades resistentes como la aplicación de tratamientos hidrotérmicos. En la actualidad, existe un gran número de variedades comerciales de caña de azúcar, originadas por un proceso de mejora genética.



Figura 1. Estructura reproductora de *S. scitamineum* en forma de látigo desarrollada en el ápice de tallos de caña de azúcar.

La susceptibilidad, o la resistencia, de un cultivar se describe en base a un criterio biológico teniendo en cuenta la sintomatología y desarrollo de la enfermedad tras la infección del tejido por un microorganismo patógeno, considerándose un fenotipo resistente aquél que reduce el crecimiento, la reproducción o las actividades del patógeno relacionadas con la enfermedad. Si la enfermedad se desarrolla, los síntomas son menos severos que en un cultivar susceptible.

Algunas sustancias segregadas por el patógeno actúan como **elicitores**, desencadenando una reacción de defensa en la planta. El concepto de elicitor es un anglicismo acuñado para procesos fitopatogénicos, y hace referencia a aquellas moléculas producidas por patógenos que interactúan con receptores de la planta, activando en ella una doble respuesta, de sensibilidad y de defensa.

MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE INOCULACIÓN

En el desarrollo de estas prácticas se va a trabajar con dos especies biológicas distintas, la primera actúa como huésped y la segunda como agente patógeno:

- ***Saccharum officinarum* L.:** caña de azúcar.
- ***Sporisorium scitamineum* (Syd.) Piepenbr. & Oberw. 2002 (= *Ustilago scitaminea* Sydow & P. Sydow):** hongo basidiomicete causante de la enfermedad del carbón.

Se van a utilizar dos cultivares comerciales de caña de azúcar con diferente grado de sensibilidad frente a la enfermedad del carbón, sembrados en el invernadero del Real Jardín Botánico Alfonso XIII (UCM) durante 12 meses antes de empezar la experimentación.

- ***Saccharum officinarum* L., cv. Mayarí 55-14**: resistente a la enfermedad del carbón.
- ***Saccharum officinarum* L., cv. Barbados 42231**: altamente susceptible a la enfermedad del carbón.

De la planta, se va a trabajar con la parte central de hojas jóvenes completamente desarrolladas, eligiendo la tercera hoja desde el nacimiento del tallo aéreo. Las hojas se taladrarán a ambos lados de la nervadura central obteniendo 30 discos de aproximadamente 0,5 cm. de diámetro para el ensayo enzimático, y secciones rectangulares de 2 cm² de área para el análisis histológico. En ambos casos, las secciones de hoja se permean con 0,6 mL de *iso*-propanol al 4% durante 1 hora a 37 °C. La incubación se llevará a cabo en un volumen total de 15 mL conteniendo un sistema amortiguador que será distinto según el estudio posterior que se vaya a realizar. Para el ensayo enzimático de β -1,3-gucanasa, peroxidasa, valoración de fenoles y el estudio histológico se utilizará tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, y para la enzima quitinasa se trabajará con tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,0.

La inoculación simulada se hará *in vitro* utilizando un **elicitor** exógeno de origen patogénico. Las secciones de hoja preincubadas con *iso*-propanol, que permeabiliza las membranas celulares, se incubarán a continuación añadiendo al medio 1 mL de un elicitor de *Sporisorium scitamineum* durante 22 horas a 37 °C en oscuridad. Los controles se realizarán en ausencia del mismo. Transcurrido este tiempo, se llevarán a cabo los distintos ensayos planteados en estas prácticas.

La **extracción del elicitor** fúngico se detalla a continuación: teliosporas de resistencia de *Sporisorium scitamineum* (20 mg), aisladas de látigos recolectados en plantas enfermas, se incuban en 200 mL de medio LILLY y BARNETT (1951) a 38 °C durante 5 días. El micelio formado se recoge, se lava con agua destilada, se seca, pesa y finalmente se pulveriza en nitrógeno líquido. El polvo se extrae con 25 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,8. Tras una centrifugación (5.000 \times g durante 10 minutos a 4 °C), se añaden al sedimento 20 mL metanol 80% v/v y la mezcla se agita durante 4 horas a 38 °C. Se realiza una segunda centrifugación, el sedimento se lava con 5 mL de metanol y se seca en flujo de aire durante dos horas. Se lleva a cabo un segundo lavado con tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 y tras él, el sedimento se resuspende en 25 mL del mismo tampón. La mezcla se autoclava a 120 °C durante 30 minutos. Tras una tercera centrifugación (10.000 \times g durante 20 minutos a 4 °C), se obtiene un sobrenadante empleado como **elicitor**. Método de MC GHIE *et al.* (1997), modificado por DE ARMAS *et al.* (2007).

PRÁCTICA 1. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

Cuando se produce una interacción primaria entre el elicitor producido por un patógeno y el receptor en la planta, se desencadenan una serie de respuestas iniciales

encaminadas a detener la entrada y/o avance del patógeno. Como respuesta bioquímica defensiva local se produce una acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP: pathogenesis related proteins) producto de la activación de factores de transcripción. Este término incluye aquellas proteínas cuya expresión se ve inducida *de novo* bajo condiciones patogénicas.

Las familias de las proteínas PRP se clasifican atendiendo a sus propiedades físicas y biológicas. Se valorarán en esta práctica la actividad β -1,3-glucanasa, quitinasa y peroxidasa.

Medida de actividad β -1,3-glucanasa *in vitro*

Esta enzima interviene de forma directa, hidrolizando las moléculas de glucanos (Fig. 2) que constituyen de forma mayoritaria la estructura de la pared celular en hongos (Fig. 3). Pero también puede actuar de forma indirecta, liberando oligosacáridos que son reconocidos por la planta como elicitores, activando el sistema de defensa.

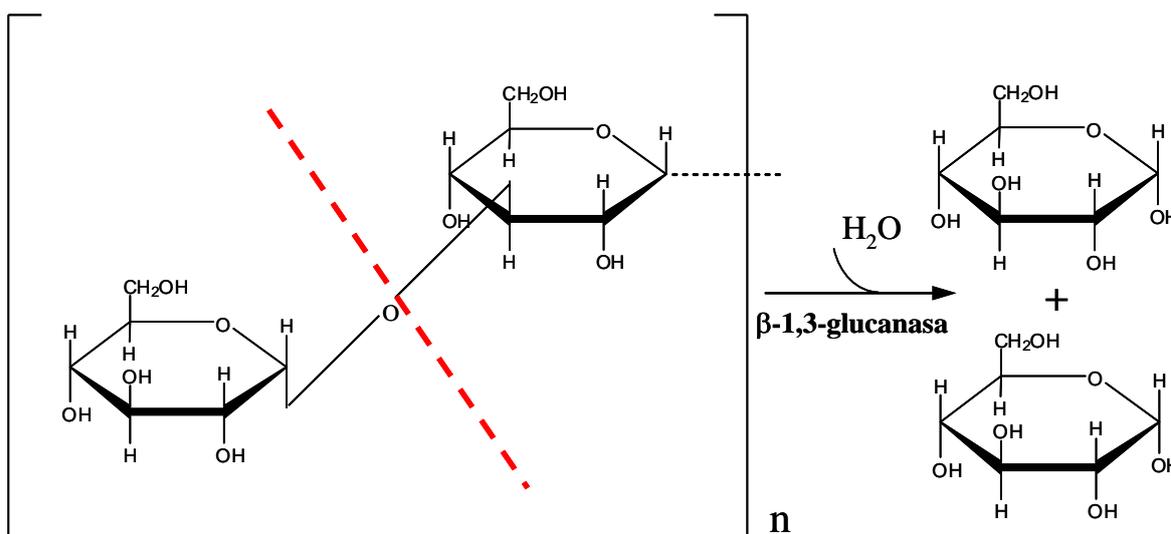


Figura 2. Glucano: polímero compuesto de unidades de glucosa con uniones β -1,3. La β -1,3-glucanasa hidroliza este enlace liberando monómeros de glucosa o el disacárido laminaribiosa, ambos con capacidad reductora.

La actividad de esta enzima se mide colorimétricamente (Fig. 4) según el método laminarina - ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Después de la permeabilización e inoculación del tejido vegetal, se toman 2.5 mL del medio de preincubación, a este volumen se le añade 0.5 mL de laminarina comercial al 0,75% (p/v). Esta reacción se lleva a cabo en un baño a 37 °C durante 45 minutos. Pasado este tiempo, se para la reacción cogiendo 0,5 mL del medio de incubación, al que se le añaden 0,5mL de DNS, y se mantiene a 100 °C durante 5

minutos. Cuando se haya enfriado, se le añaden 5mL de agua destilada, y se mide densidad óptica a 540 nm.

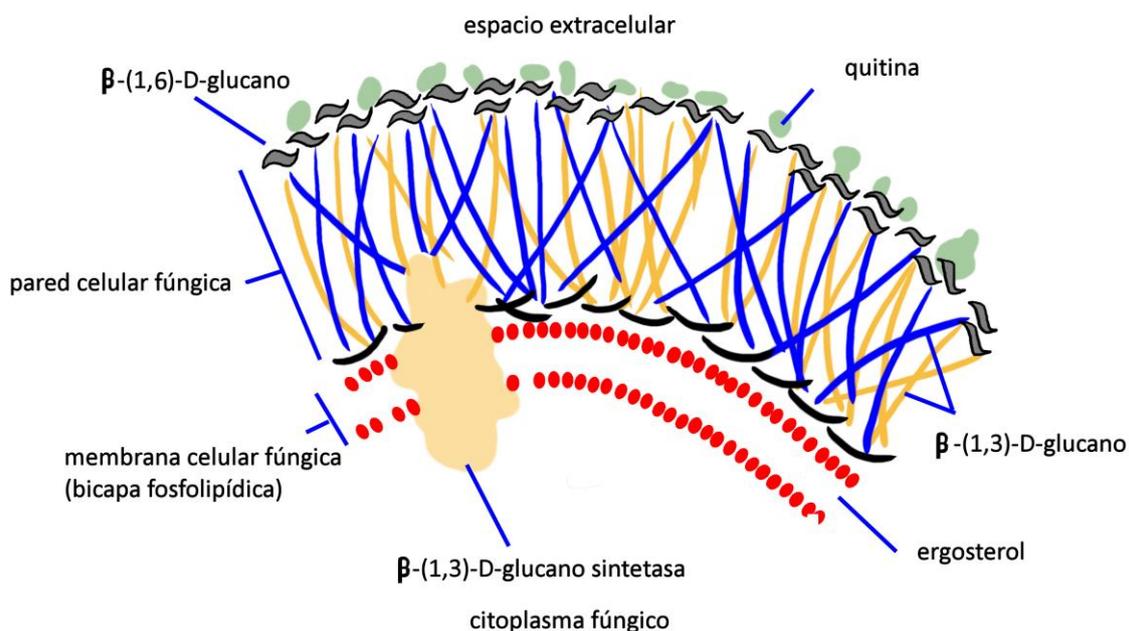


Figura 3. Estructura de la pared celular de hongos.

De esta valoración colorimétrica se obtiene la cantidad de azúcares reductores obtenidos después de la degradación de la laminarina comercial, reacción catalizada por la β-1,3- glucanasa. Los valores obtenidos en unidades de absorbancia se transformaron en mg/mL de azúcares reductores interpolando en la siguiente recta patrón:

$$y = 0,466x - 0,012$$

(y = DO 540 nm; x = mg/mL azúcares reductores; r = 0,96)

La actividad enzimática la expresaremos como mg de azúcares reductores formados por minuto y por mg de tejido vegetal fresco.

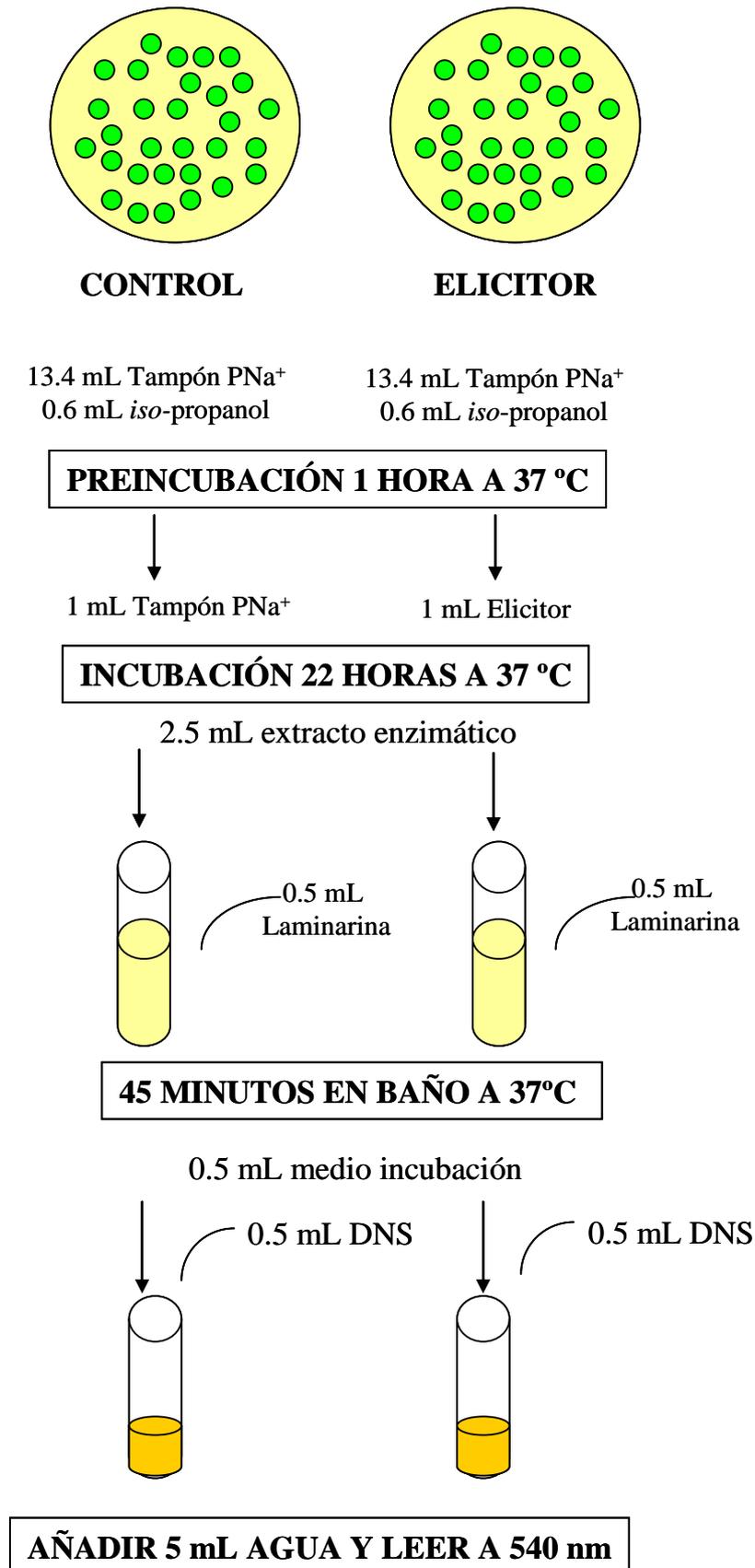


Figura 4. Método para valorar actividad β -1,3-glucanasa *in vitro*.

Medida de actividad quitinasa *in vitro*

Las quitinasas son proteínas que hidrolizan quitina (Fig. 5), otro componente mayoritario de la pared celular de hongos filamentosos (Fig. 3). Hidrolizan el enlace C-C de dos moléculas de N-acetilglucosamina consecutivas, tanto por mecanismo endolítico o exolítico.

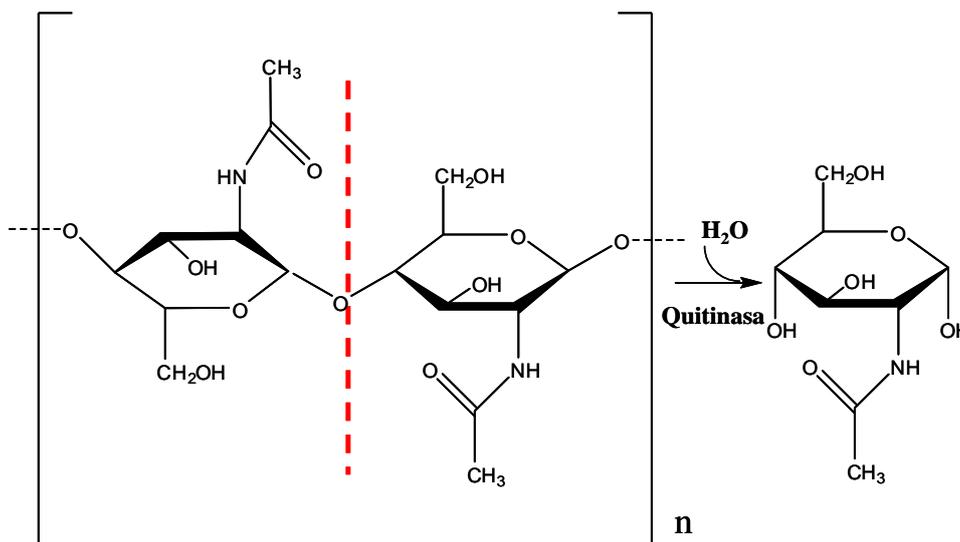


Figura 5 Quitina: polímero de unidades de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlace β(1-4). La quitinasa actúa sobre este enlace liberando monómeros de N-acetil-D-glucosamina.

Para valorar quitinasa tras inoculación *in vitro* de discos de hoja de caña, se va a utilizar quitina comercial. La actividad de esta enzima se mide colorimétricamente (Fig. 6) con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Después de la permeabilización e inoculación del tejido vegetal, se toman 3 mL del medio de preincubación, a este volumen se le añaden 0,5 mL de quitina comercial al 0,084% (p/v). La reacción se lleva a cabo en un baño a 37 °C durante 45 minutos. Pasado este tiempo, se para la reacción cogiendo 1,5 mL del medio de incubación al que se le añaden 1,5 mL de DNS y se mantiene a 100 °C durante 5 minutos. Cuando se haya enfriado, se le añaden 10 mL de agua destilada, y se mide densidad óptica a 540 nm. Los valores obtenidos en unidades de absorbancia se transforman en mg/mL de N-acetil-D-glucosamina interpolando en la recta patrón:

$$y = 0,5166x + 0,0308$$

$$(y = \text{DO } 540 \text{ nm}; x = \text{mg/mL N-acetil-D-glucosamina}; r = 0,97)$$

La actividad enzimática la expresamos como mg N-acetil-D-glucosamina formados por minuto y por mg de tejido vegetal fresco.

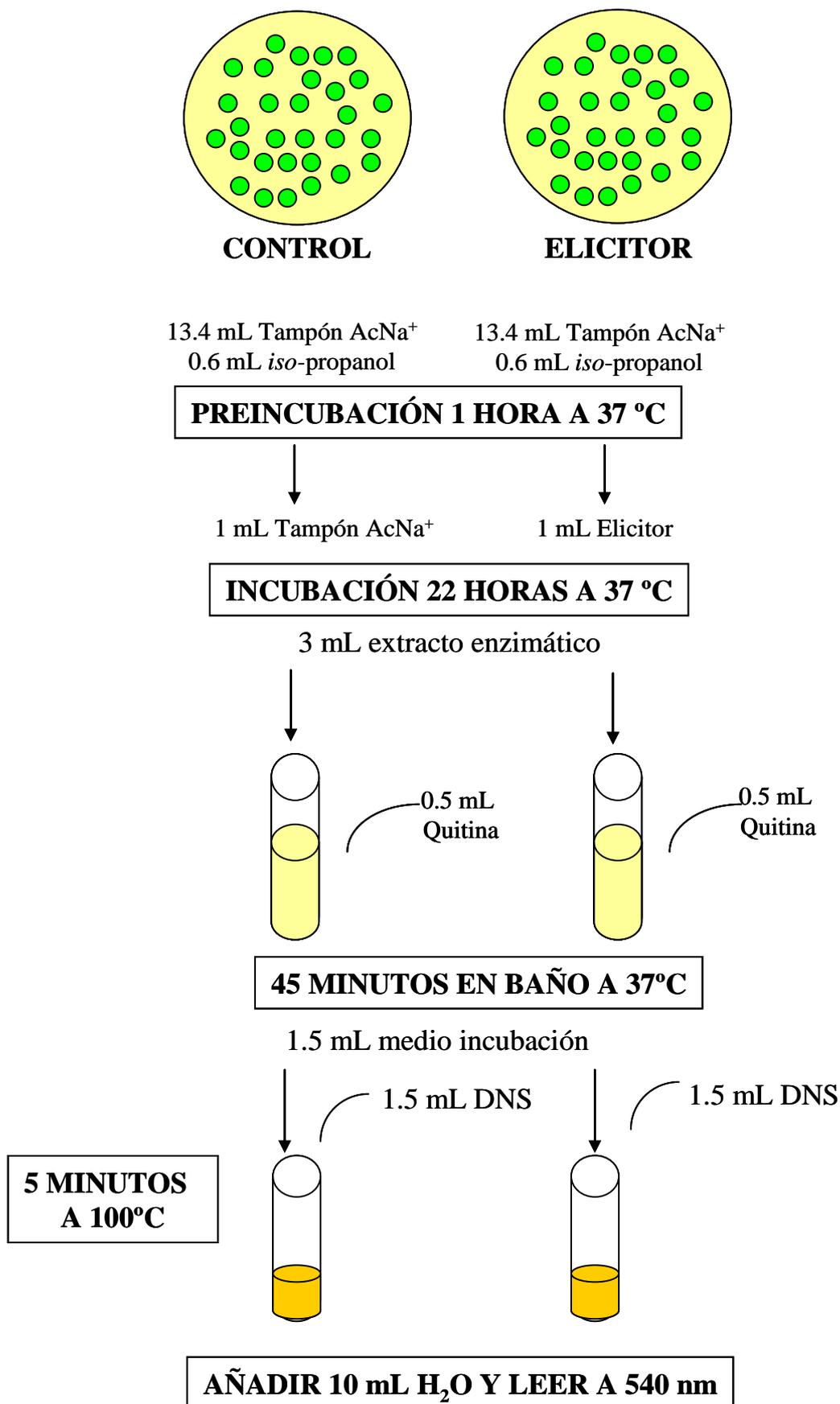


Figura 6. Método para valorar actividad quitinasa *in Vitro*.

Medida de actividad peroxidada *in vitro*

Las peroxidases son hemoproteínas que catalizan la oxidación monoelectrónica de diferentes sustratos a expensas del H₂O₂. Ciertos compuestos donadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina), son oxidados por medio de peróxidos (H₂O₂).



Las peroxidases vegetales de secreción son de naturaleza glicoproteica, y están localizadas en las paredes celulares y vacuolas. Están implicadas en varios procesos fisiológicos y de desarrollo, participando en la oxidación de fenoles y especialmente en la lignificación como consecuencia de aumentar la velocidad de polimerización de los mismos.

El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa. El tetraguayacol desarrolla un color pardo que se mide a 470 nm (Fig. 7).

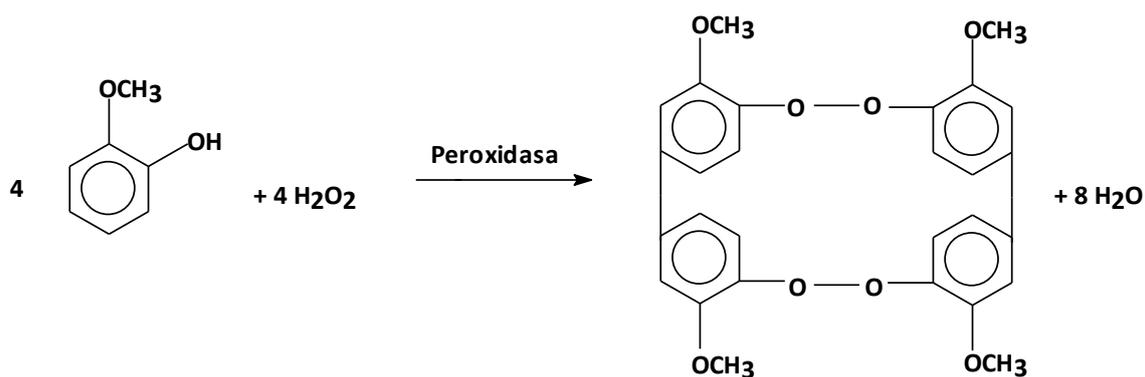


Figura 7. El peróxido de hidrógeno se acopla a una peroxidada que utiliza guayacol (incoloro) como sustrato que se oxida a tetraguayacol (rojo ladrillo).

El peróxido de hidrógeno se genera en células infectadas inmediatamente después de reconocer a un patógeno potencial: se producen alteraciones en el metabolismo del oxígeno que genera especies de oxígeno reactivas (ROS). Este fenómeno se conoce como explosión oxidativa, y es uno de los más rápidos que tiene lugar tras el reconocimiento del patógeno.

Después de la permeabilización e inoculación del tejido vegetal, se maceran los 30 discos de hoja en nitrógeno líquido. El polvo se resuspende en 7 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 y se centrifuga (10.000 × g durante 15 minutos a 2 °C). Se recoge el sobrenadante del que se utilizarán 0,5 mL para la mezcla de reacción + 2,7 mL tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 + 30 µL de guayacol. Esta mezcla de reacción será el blanco de cada medida. Inmediatamente después se añaden 200 µL de H₂O₂, en este momento comienza la reacción enzimática y se podrá valorar color. La velocidad

de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de la absorbancia en relación con el tiempo. Se medirá el tiempo que transcurre para observar un incremento de 0,1 unidades en los valores de absorbancia a 470 nm.

La **velocidad de reacción (Vr)** se define como: ΔDO a 470 nm (0,1) Tiempo(segundos)⁻¹.

Una unidad de **actividad específica (AE)** se define como la velocidad de reacción por mg de tejido vegetal fresco en miligramos.

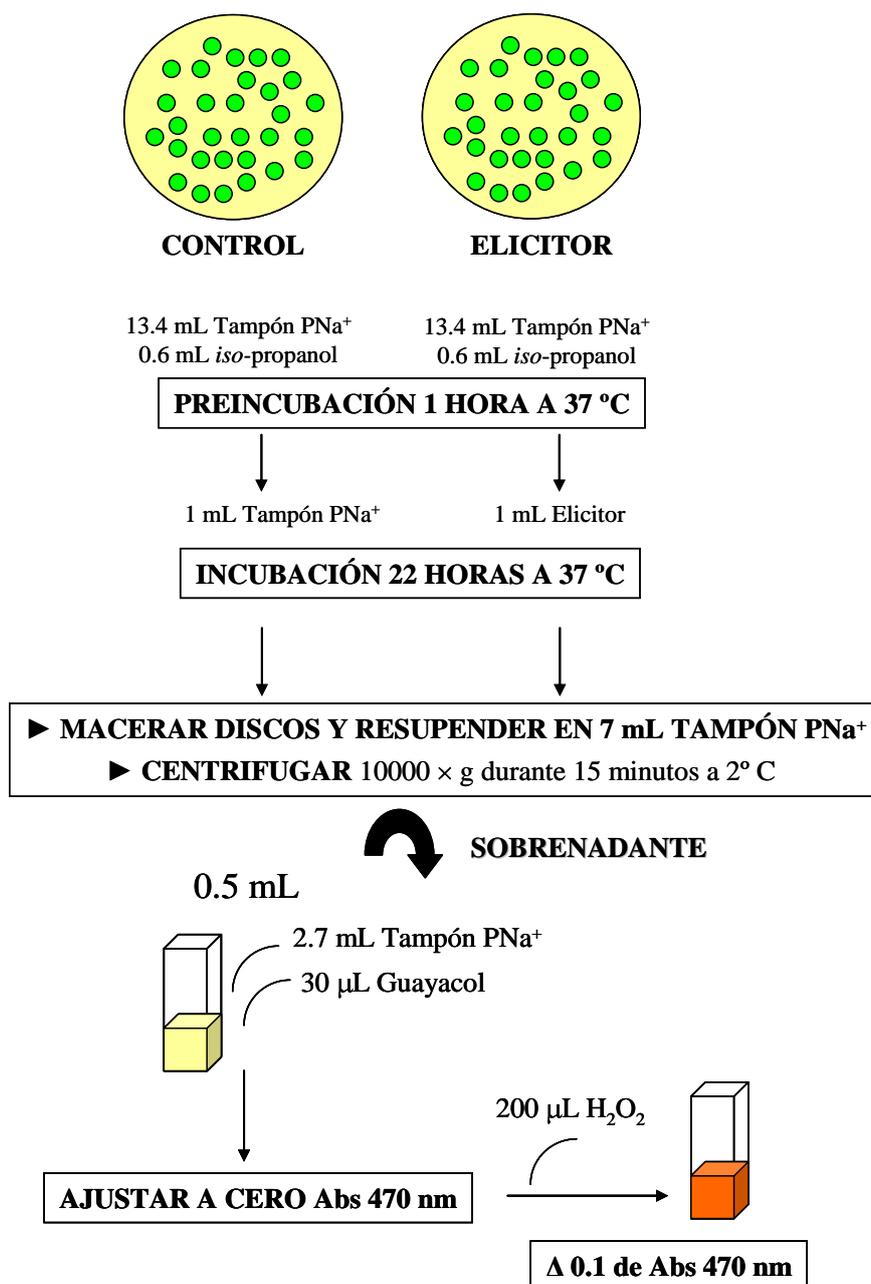


Figura 8. Método para valorar actividad peroxidasa *in vitro*

| PAREJA | MUESTRA | Peso fresco (mg) | D.O (540 nm) | Azúcares reductores (mg·mL ⁻¹) | Vr (mg producto·min ⁻¹) | AE (mg producto·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ Pf) |
|--------|--------------|------------------|--------------|--|-------------------------------------|---|
| 1 | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| 2 | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| 3 | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| 4 | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| MEDIA | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| 5 | B 42-231 (C) | | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | | |
| 6 | B 42-231 (C) | | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | | |
| 7 | B 42-231 (C) | | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | | |
| MEDIA | B 42-231 (C) | | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | | |

Tabla 1. Valoración actividad β-1,3- glucanasa.

| PAREJA | MUESTRA | Peso fresco (mg) | D.O (540 nm) | N-acetil-D-glucosamina (mg·mL ⁻¹) | Vr (mg producto·min ⁻¹) | AE (mg producto·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ Pf) |
|--------|--------------|------------------|--------------|---|-------------------------------------|---|
| 1 | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| 2 | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| 3 | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| 4 | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| MEDIA | My 55-14 (C) | | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | | |
| 5 | B 42-231 (C) | | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | | |
| 6 | B 42-231 (C) | | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | | |
| 7 | B 42-231 (C) | | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | | |
| MEDIA | B 42-231 (C) | | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | | |

Tabla 2. Valoración actividad quitinasa.

| PAREJA | MUESTRA | Peso fresco (mg) | Δ D.O (0.1) (470 nm) | Vr (Δ D.O segundo ⁻¹) | AE (Δ D.O segundo ⁻¹ ·mg ⁻¹ Pf) |
|--------|--------------|------------------|-----------------------------|---|---|
| 1 | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| 2 | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| 3 | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| 4 | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| MEDIA | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| 5 | B 42-231 (C) | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | |
| 6 | B 42-231 (C) | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | |
| 7 | B 42-231 (C) | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | |
| MEDIA | B 42-231 (C) | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | |

Tabla 3. Valoración actividad peroxidasa.

PRÁCTICA 2. VALORACIÓN DE FENOLES SOLUBLES

En muchas plantas, una de las reacciones de defensa consiste en la liberación temprana de fenoles preformados y una posterior inducción masiva, debida a la estimulación del metabolismo de los fenilpropanoides.

Como primera respuesta los fenoles acumulados en la vacuola se liberarán al citoplasma desde donde pueden pasar a la pared celular, aquí serán utilizados como monolignoles que por acción de peroxidasas se van a polimerizar para formar lignina.

Después de la permeabilización e inoculación del tejido vegetal, se maceran los 30 discos de hoja en nitrógeno líquido. El polvo se resuspende en 7 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 y se centrifuga ($10.000 \times g$ durante 15 minutos a 2 °C). Se recoge el sobrenadante del que se utilizarán 2 mL para la valoración espectrofotométrica de los compuestos fenólicos solubles. Se van extraer mediante reparto de fases en 3 mL de éter dietílico, éste se lleva a sequedad, y los fenoles se resuspenderán en 1,5 mL de agua destilada para poder valorarlos mediante el método colorimétrico de Folin adaptado al análisis de fenoles (Fig. 9).

De esta valoración colorimétrica se obtiene la cantidad de fenoles solubles de los discos de hoja. Los valores obtenidos en unidades de absorbancia se transformaron en mg/mL de fenoles solubles interpolando en la siguiente recta patrón:

$$y = 25,286x + 0,035$$

(y = DO 760 nm; x = mg/mL fenoles solubles; r = 0,98)

La cantidad de fenoles solubles la expresaremos en mg por mg de tejido vegetal fresco.



Figura 9. Método para cuantificar fenoles solubles *in vitro*

| PAREJA | MUESTRA | Peso fresco (mg) | D.O (760 nm) | Concentración (mg·mL-1) | mg fenol·mg ⁻¹ Pf |
|--------|--------------|------------------|--------------|-------------------------|------------------------------|
| 1 | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| 2 | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| 3 | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| 4 | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| MEDIA | My 55-14 (C) | | | | |
| | My 55-14 (E) | | | | |
| 5 | B 42-231 (C) | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | |
| 6 | B 42-231 (C) | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | |
| 7 | B 42-231 (C) | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | |
| MEDIA | B 42-231 (C) | | | | |
| | B 42-231 (E) | | | | |

Tabla 4. Valoración contenido fenoles solubles.

PRÁCTICA 3. CITOAGLUTINACIÓN DE TELIOSPORAS DE *S. SCITAMINEUM* INDUCIDO POR GLICOPROTEÍNAS DE CAÑA DE AZÚCAR

La planta de caña de azúcar sintetiza varias de estas glicoproteínas como respuesta a heridas mecánicas, picaduras de insectos, invasión por patógenos o deterioro en pie o post-cosecha. La mitad glúcídica de esta glicoproteína está compuesta de fructosa y galactitol y su masa molecular oscila entre 9 y 800 kDa, definiéndose entonces dos categorías distintas, MMMG (bajo y mediano) y HMMG (alto peso molecular). Los restos de fructosa se unen mediante enlaces β -1,2 mientras que bloques galactitol se introducen en la secuencia del fructano mediante enlaces éter.

Muestras de teliosporas (1.0 mg) fueron flotadas sobre 2mL de HMMG o MMMG obtenidos de cañas previamente inoculadas. Después de 1 hora de incubación, las esporas fueron observadas al microscopio óptico, observándose el fenómeno de citoaglutinación respecto de las teliosporas control flotadas sobre agua destilada.

La desorción será observada agregando sobre las teliosporas aglutinadas una gota (sic) de una disolución de sacarosa 100 mM. Si las células se dispersan, esto será debido a que tanto HMMG como MMMG utilizan su resto polisacárido, con abundantes enlaces β -1,2-fructofuranosil-fructofuranósido para formar puentes de hidrógeno con dominios aminoacídicos particulares de receptores fúngicos de membrana. Un exceso de sacarosa β -1,2-glucopiranosil-fructofuranósido desplazaría el enlace del polisacárido HMMG o MMMG de dicho dominio, substituyéndolo en el y liberando la teliospora de la glicoproteína de caña que las mantenía unidas. La citoaglutinación va generalmente acompañada de inhibición de la germinación de las teliosporas, lo que supone que ambas HMMG y MMMG son PRP que dificultan la invasión de la planta por el micelio fúngico.

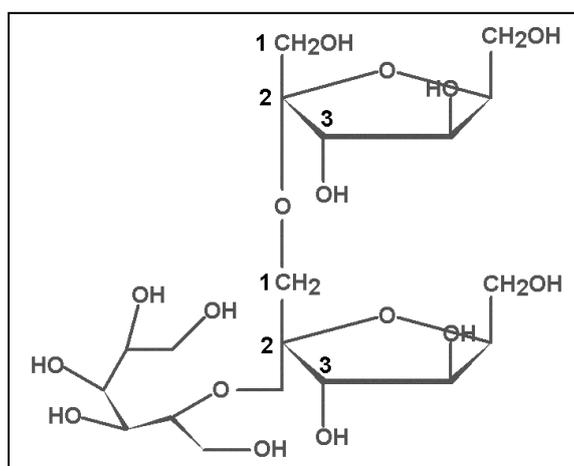


Figura 10. Fracción glúcídica de glicoproteínas de caña de azúcar.

PRÁCTICA 4. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL GRADO DE LIGNIFICACIÓN

En esta práctica se propone el estudio del refuerzo de la lignificación en el esclerénquima y el xilema de hoja de caña de azúcar como una respuesta mecánica de resistencia frente a la invasión de *S. scitamineum*. La infección fúngica libera compuestos fenólicos preformados y además induce el metabolismo de los fenilpropanoides. Gran parte de éstos se encuentran unidos a la celulosa y hemicelulosa de las paredes celulares formando lignina (Fig. 11) que supone una barrera mecánica a la invasión fúngica.

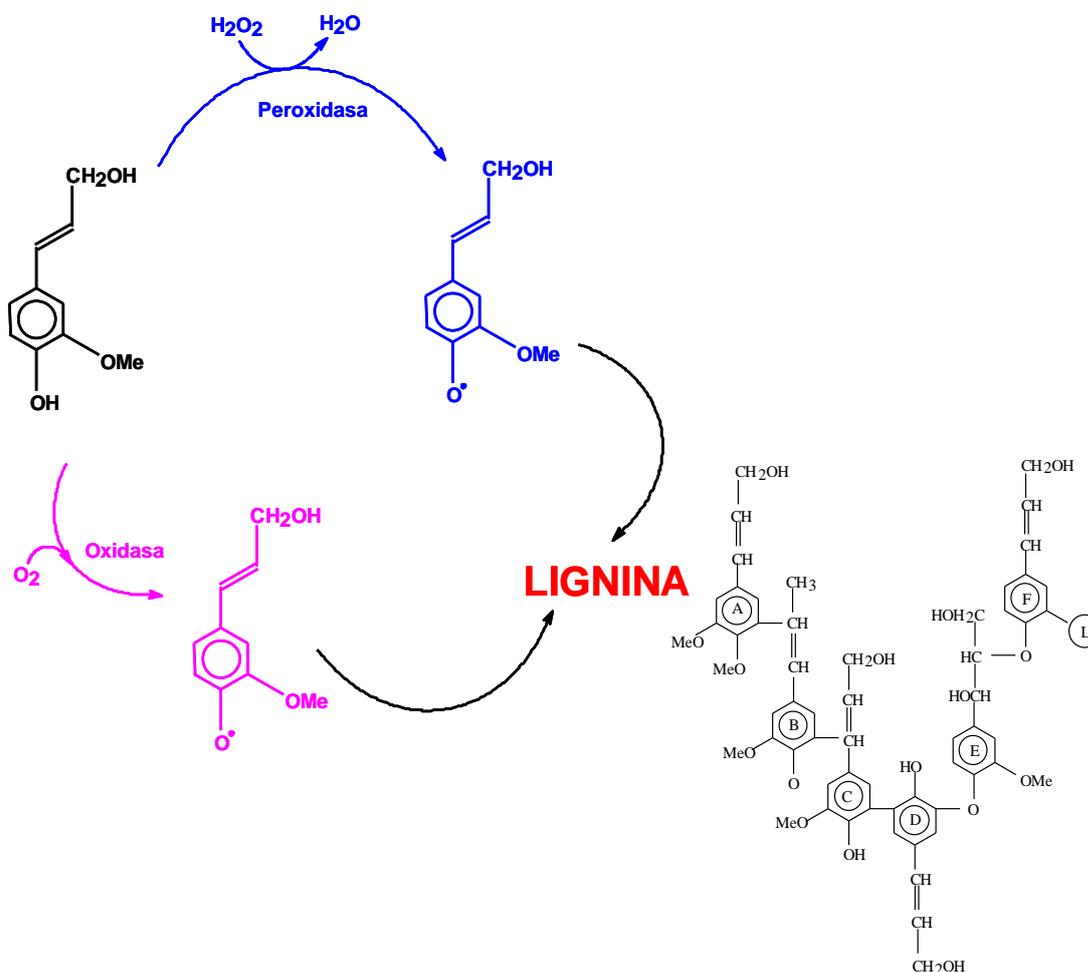


Figura 11. Lignina: polímero de derivados fenilpropanícos formado por acoplamiento oxidativo de radicales monolignoles.

Saccharum officinarum es una planta C₄ cuyas hojas muestran una anatomía Kranz o anatomía en corona (Fig. 12). Los paquetes vasculares se encuentran dispersos entre las células del mesófilo, y cada uno se encuentra rodeado por las células parenquimáticas de gran tamaño denominadas células de la vaina.

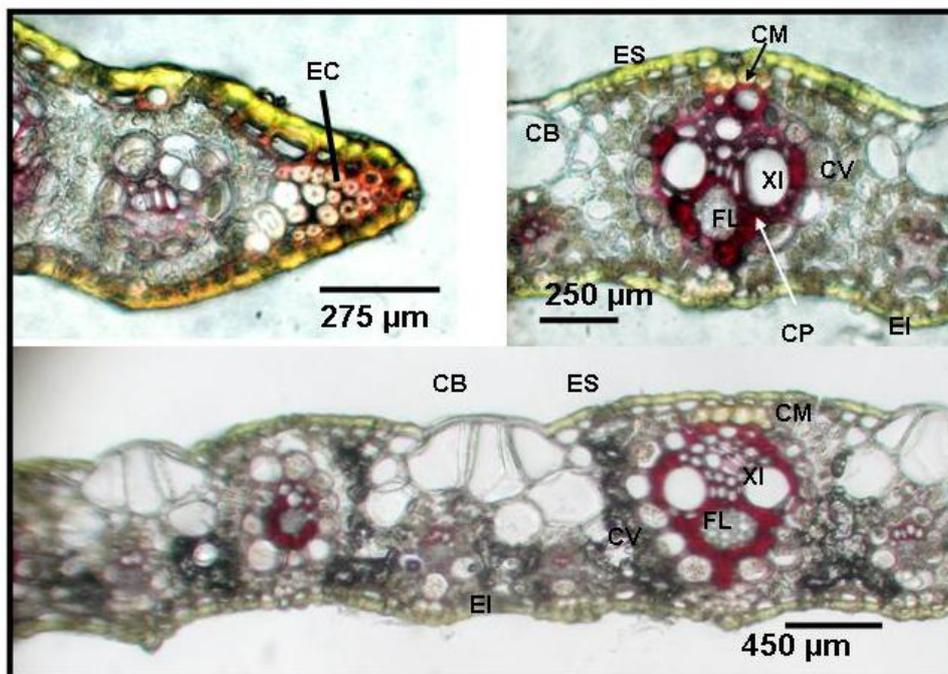


Figura 12. Secciones transversales de hoja de caña de azúcar. EC: esclereidas que rellenan el borde del limbo foliar. ES: epidermis superior. EI: epidermis inferior. CB: células buliformes. CV: células de la vaina. CM: esclereidas del tipo de células muelle. CP: células pétreas. XI: xilema. FL: floema.

Los elementos importantes en la lignificación son el esclerénquima y los vasos xilemáticos, por lo que se estudiará la lignificación en:

- Esclereidas del borde del limbo foliar.
- Esclereidas muelle.
- Esclereidas del paquete vascular.

Se procederá a hacer un análisis comparativo de la evolución de la lignificación en hojas que han estado o no en contacto con el patógeno, mediante detección citoquímica de lignina con floroglucinol.

Obtención, tinción y visualización de cortes

A partir de los fragmentos de la parte central de las hojas se obtienen cortes de 10 µm de grosor con un microtomo de congelación.

Las estructuras lignificadas se visualizan mediante tinción con floroglucinol/ HCl. Para ello los cortes de hoja se incuban en una solución de floroglucinol 1% (w/v) en metanol 100% durante 24 horas. Después de que los cortes ya aclarados se incuben en ácido clorhídrico diluido, se montan en portas a los que se les añade unas gotas de HCl. El estudio al microscopio óptico debe ser inmediato, pues la tinción no es permanente.

Análisis de imagen

Para estudiar el desarrollo y diferenciación del esclerénquima, así como las variaciones en grosor de la pared de los elementos xilemáticos, se llevará a cabo un análisis de imagen usando el programa *Image Tool 3.0*.

Para el estudio de la superficie que ocupan las células lignificadas se escogen dos zonas de referencia. Una primera zona abarca las células epidérmicas que contactan con las **células muelle** (esclereidas subepidérmicas que conectan con los haces conductores), así como las propias **células muelle**, y el paquete vascular, incluidas las células de la vaina. La segunda zona incluye exclusivamente los tejidos vasculares y esclereidas asociadas a ellos.

Para analizar el grosor de la pared en esclereidas en fragmentos de hoja sometidos o no a tratamiento con elicitador se medirán tres áreas en células aisladas. Estas son el área total de la célula, el área del lumen y, por diferencia entre ambas, el área de la pared. Se calculará a continuación el porcentaje de la superficie celular que representa la pared lignificada en esclereidas pertenecientes a fragmentos control y en aquellas de fragmentos sometidos a tratamiento con elicitador. El procedimiento que se seguirá para estudiar las variaciones en el grosor de la pared en los elementos xilemáticos con o sin tratamiento con elicitador será el mismo.

| ÁREAS | CONTROL | CONTROL | TRATADOS CON ELICITOR | TRATADOS CON ELICITOR |
|--------------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| BARBADOS 42231 | Medidas absolutas (cuentas de área) | Medidas relativas al área total (%) Medidas relativas al área del paquete vascular (%) | Medidas absolutas (cuentas de área) | Medidas relativas al área total (%) Medidas relativas al área del paquete vascular (%) |
| TOTAL DE REFERENCIA | | | | |
| ESCLEREIDAS "MUELLE" SUPERIOR | | | | |
| ESCLEREIDAS "MUELLE" INFERIOR | | | | |
| PAQUETE VASCULAR | | | | |
| ESCLEREIDAS PAQUETE VASCULAR | | | | |
| TOTAL ESCLEREIDAS | | | | |

| ÁREAS | CONTROL | CONTROL | TRATADOS CON ELICITOR | TRATADOS CON ELICITOR |
|-------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| MAYARÍ 55-14 | Medidas absolutas (cuentas de área) | Medidas relativas al área total (%) Medidas relativas al área del paquete vascular (%) | Medidas absolutas (cuentas de área) | Medidas relativas al área total (%) Medidas relativas al área del paquete vascular (%) |
| TOTAL DE REFERENCIA | | | | |
| ESCLEREIDAS "MUELLE" SUPERIOR | | | | |
| ESCLEREIDAS "MUELLE" INFERIOR | | | | |
| PAQUETE VASCULAR | | | | |
| ESCLEREIDAS PAQUETE VASCULAR | | | | |
| TOTAL ESCLEREIDAS | | | | |

Tabla 5. Análisis de imagen de las distintas áreas de lignificación.

| BARBADOS 42231 | CONTROL | | | TRATADOS CON ELICITOR | | |
|--------------------------------|--------------|------------------|----------------------------------|-----------------------|------------------|----------------------------------|
| GROSOR PARED ESCLEREIDAS | Área celular | Área de la pared | Área pared relativa al total (%) | Área celular | Área de la pared | Área pared relativa al total (%) |
| ESCLEREIDAS DEL BORDE FOLIAR | | | | | | |
| ESCLEREIDAS "MUELLE" SUPERIOR | | | | | | |
| ESCLEREIDAS "MUELLE" INFERIOR | | | | | | |
| TOTAL ESCLEREIDAS "MUELLE" | | | | | | |
| ESCLEREIDAS RODEANDO AL XILEMA | | | | | | |
| ESCLEREIDAS RODEANDO AL FLOEMA | | | | | | |
| ESCLEREIDAS PAQUETE VASCULAR | | | | | | |

| MAYARÍ 55-14 | CONTROL | | | TRATADOS CON ELICITOR | | |
|---------------------------------|----------------|------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------|----------------------------------|
| GROSOR PARED ESCLEREIDAS | Área celular | Área de la pared | Área pared relativa al total (%) | Área celular | Área de la pared | Área pared relativa al total (%) |
| ESCLEREIDAS DEL BORDE FOLIAR | | | | | | |
| ESCLEREIDAS "MUELLE" SUPERIOR | | | | | | |
| ESCLEREIDAS "MUELLE" INFERIOR | | | | | | |
| TOTAL ESCLEREIDAS "MUELLE" | | | | | | |
| ESCLEREIDAS RODEANDO AL XILEMA | | | | | | |
| ESCLEREIDAS RODEANDO AL FLOEMA | | | | | | |
| ESCLEREIDAS PAQUETE VASCULAR | | | | | | |

Tabla 6. Análisis de imagen del grosor pared de esclereidas.

| GROSOR PARED ELEMENTO XILEMÁTICO | Área total | | Área pared | | Porcentaje que representa el área de la pared (%) | |
|---|------------|--------------|------------|--------------|---|--------------|
| | CONTROL | CON ELICITOR | CONTROL | CON ELICITOR | CONTROL | CON ELICITOR |
| BARBADOS 42231 | | | | | | |
| Grande | | | | | | |
| Mediano | | | | | | |
| Pequeño | | | | | | |

| GROSOR PARED ELEMENTO XILEMÁTICO | Área total | | Área pared | | Porcentaje que representa el área de la pared (%) | |
|---|------------|--------------|------------|--------------|---|--------------|
| | CONTROL | CON ELICITOR | CONTROL | CON ELICITOR | CONTROL | CON ELICITOR |
| MAYARÍ 55-14 | | | | | | |
| Grande | | | | | | |
| Mediano | | | | | | |
| Pequeño | | | | | | |

Tabla 7. Análisis de imagen del grosor pared vasos xilemáticos.

BIBLIOGRAFÍA

De Armas, R.; Santiago, R.; Legaz, M.E. y 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.

Lilly, V.G. y Barnett, H.L. 1951. *Physiology of the fungi*. McGraw-Hill, New York, USA.

McGhie, T.K.; Masel, N.P.; Maclean, D.; Croft, B.J. y Smith, G.R. 1997. Biochemical responses of suspension-cultured sugarcane cells to an elicitor derived from the root pathogen *Pachymetra chaunorhiza*. *Australasian Journal of Plant Physiology*, 24: 143-149.

Recibido: 10 julio 2009.

Aceptado: 7 noviembre 2009.