

La actividad peroxidasa en caña de azúcar (*Saccharum* spp): evolución temporal de la reacción y su posible rol en la resistencia a la roya marrón (*Puccinia melanocephala*, H&P Sydow)

MACHADO ASSEFH, C.R.^{1,4}; COLLAVINO, N.G.¹; DAZ, M.²; POCOVÍ, M.I.¹; MARIOTTI, J.³

RESUMEN

La roya marrón de la caña de azúcar, causada por *Puccinia melanocephala*, es una enfermedad foliar de preocupación en casi todos los países donde se cultiva la caña de azúcar. Los programas de mejoramiento del cultivo se encuentran en la búsqueda de fuentes de resistencia de la planta al patógeno. Debido a que se demostró que las peroxidases vegetales participan en la defensa contra los fitopatógenos, el objetivo de este trabajo fue comparar la actividad peroxidasa basal de dos cultivares con respuestas contrastantes a la roya, la evolución de la actividad peroxidasa en el tiempo después de la inoculación con el patógeno y su posible relación con la resistencia o la susceptibilidad de los cultivares de caña de azúcar a la roya. La actividad de la peroxidasa se midió a 24, 48, 72 y 120 horas después de la inoculación. Dos cultivares de caña de azúcar fueron utilizados, R570 (muy resistente) y NA86-2280 (altamente susceptible). La actividad de la peroxidasa aumentó después de la inoculación en ambos cultivares pero aumentó, con mayor velocidad, en R570 hasta alcanzar un máximo a las 48 hs después de la inoculación. La actividad más alta se detectó en R570 durante todo el experimento. Las diferencias en la actividad de la peroxidasa se encontraron entre cultivares y también entre plantas inoculadas y plantas control. Se postula que tanto la actividad basal de la peroxidasa como su incremento después de la inoculación, podrían ser mecanismos complementarios que favorecen la resistencia a la roya en la caña de azúcar.

Palabras clave: *Saccharum* sp., *Puccinia melanocephala*, actividad enzimática.

ABSTRACT

Sugarcane brown rust, caused by Puccinia melanocephala, is a foliar disease of concern in almost all countries where sugarcane is grown. The sugarcane breeding programs are in the search for sources of plant

¹Laboratorio de Marcadores Moleculares, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta (UNSa). Avda. Bolivia 5150. Salta-Capital, Salta, Argentina. Correo electrónico: cristina.machado@conicet.gov.ar.

²Laboratorio de Biocatálisis, UNSa. Salta, Argentina.

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), EEA Famaillá. Ruta Provincial 301 - Km 32 4132, Tucumán, Argentina.

⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

resistance to this pathogen. Since it has been shown that plant peroxidases are involved in defence against phytopathogens, the objective of this study was to compare basal peroxidase activity of two cultivars with contrasting responses to rust, the time course of the peroxidase activity after inoculation with the pathogen and its possible relation to resistance or susceptibility of sugarcane cultivars to rust. Peroxidase activity was measured at 24, 48, 72 and 120 hours after inoculation. Two sugarcane cultivars were used, R570 (highly resistant) and NA86-2280 (highly susceptible). The peroxidase activity increased after inoculation in both cultivars, but increased more rapidly in R570 reaching a maximum at 48 hours after inoculation. A higher activity was detected in R570 throughout the experiment. The differences in the peroxidase activity were found between cultivars and also between inoculated plants and control plants. It is postulated that both basal peroxidase activity and the rate of growth after inoculation, may be complementary mechanisms that promote resistance to rust in sugarcane.

Key words: *Saccharum* sp., *Puccinia melanocephala*, enzymatic activity.

INTRODUCCIÓN

La roya marrón de la caña de azúcar (antes llamada roya común), es causada por el hongo *Puccinia melanocephala* H&P Sydow y se trata de una enfermedad foliar de importancia en la mayor parte de las áreas productivas, ya que produce pequeñas manchas amarillentas en ambos lados de las láminas foliares que, posteriormente, se tornan amarilladas. En las variedades susceptibles, se desarrollan pústulas esporulentas en el envés de las hojas atacadas (Asnaghi *et al.*, 2001). Las epidemias de esta enfermedad causan importantes pérdidas económicas en las variedades susceptibles (Rago, 2005). En la Argentina las pérdidas causadas por la enfermedad aún no se han evaluado, aunque se reconoce que son importantes y crecientes, ya que afectaron a muchas variedades en cultivo, algunas de las cuales debieron ser discontinuadas del cultivo comercial. En los últimos años varios programas de mejora genética de la caña de azúcar han incorporado entre sus objetivos la búsqueda de la resistencia genética a la roya marrón (Ramdoyal *et al.*, 2000), ya que se acepta que el modo más eficaz de controlar enfermedades es el uso de cultivares resistentes (Asnaghi *et al.*, 2004).

La mayoría de las variedades cultivadas de caña de azúcar son híbridos interespecíficos en los que intervienen, por lo menos, dos especies del género *Saccharum*: *S. officinarum* L. y *S. spontaneum* L. La primera, contribuye con aproximadamente el 80-85% del genoma, mientras que el resto es aportado principalmente por *S. Spontaneum* y, eventualmente, otras especies (Piperidis y D'Hont, 2001). A pesar de la conocida complejidad genómica (poliplodía y aneuploidía) de la caña de azúcar, la resistencia a la roya marrón parece presentar en algunos casos una relativamente alta heredabilidad. Aunque se ha descrito un gen mayor de resistencia en el cultivar R570, se considera que la resistencia presenta una herencia de tipo cuantitativa con la posible participación de varios genes de pequeño efecto (Daugrois *et al.*, 1996; Ramdoyal *et al.*, 2000; Asnaghi *et al.*, 2001). Se propusieron diferentes tipos de

escalas de evaluación de daños que se basan principalmente en la severidad de los síntomas y daños observados (Asnaghi *et al.*, 2001; 2004). Se utilizan, comúnmente, dos procedimientos para evaluar la resistencia a roya de los materiales fitotécnicos: 1) evaluaciones a campo en condiciones de alto grado de infección natural y 2) pruebas basadas en la inoculación artificial con esporas del hongo en plantas completas o en hojas separadas. La eficiencia de la selección de la resistencia a partir de estos procedimientos depende de la eficacia de los métodos de evaluación utilizados, los que son fuertemente influenciados por el ambiente, los tiempos transcurridos hasta la aparición de los síntomas y la propia subjetividad relacionada con la aplicación de escalas visuales (Ramos Leal *et al.*, 1989). La identificación de marcadores, tanto bioquímicos como moleculares, puede resultar de valor en la caracterización de las resistencias y en la identificación precisa y objetiva de los genotipos susceptibles en un programa de mejoramiento genético que facilita la selección de los tipos resistentes.

Las peroxidases vegetales (EC 1.11.1.7), designadas frecuentemente como peroxidases clase III, son enzimas monoméricas que, usualmente, se encuentran glicosiladas (Luhová *et al.*, 2003; Welinder *et al.*, 1992) y son responsables de dos líneas catalíticas. En su ciclo regulan y catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno tomando electrones de varias moléculas donantes que pueden ser fenoles, precursores de lignina o metabolitos secundarios. Se ha descrito un ciclo catalítico independiente que conduce a la formación de varios compuestos radicales (Pascardi *et al.*, 2005). Debido a ambos ciclos catalíticos, las peroxidases vegetales (Prxs) pueden generar compuestos de oxígeno reactivo o R.O.S. (Reactive Oxygen Species) (Mličková *et al.*, 2004), polimerizar compuestos de la pared celular y regular los niveles de peróxido de hidrógeno. Las peroxidases fueron implicadas también en una amplia gama de procesos fisiológicos tales como lignificación, suberización, metabolismo de auxinas, ensamblado de proteínas de la pared celular, tolerancia a sales, estrés oxida-

tivo y defensa contra el ataque de patógenos (Tognoli *et al.*, 2002). Son un grupo muy estudiado de proteínas relacionadas a la patogénesis o proteínas PR (pathogenesis related proteins) que se inducen en los tejidos vegetales después de la infección por patógenos (Van Loon *et al.*, 2006). La actividad de las peroxidasas o su expresión en plantas superiores puede ser inducida por hongos (Sasaki *et al.*, 2004, 2007), bacterias (Young *et al.*, 1995; Lavania *et al.*, 2006) y virus (Lagrimini y Rothstein, 1987; Hiraga *et al.*, 2000; Diaz-Vivancos *et al.*, 2006). La actividad peroxidasa puede incrementar en plantas infectadas por patógenos, y la resistencia a enfermedades y la actividad peroxidasa frecuentemente se encuentran correlacionadas (Johnson y Cuningham, 1972; Delannoy *et al.*, 2003; Mlíčková *et al.*, 2004; Van Loon *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar y evaluar la evolución en el tiempo de la actividad peroxidasa en la caña de azúcar en respuesta a la inoculación con roya marrón en dos cultivares contrastantes por su resistencia a la enfermedad y su posible relación con la infección con roya marrón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y fúngico

Los cultivares R570 (altamente resistente a roya marrón) y NA 86-2280 (altamente susceptible) fueron utilizados en las diferentes etapas de esta investigación. Las plantas de ambas variedades fueron criadas durante 45 días en una cámara de crecimiento (21-24 °C, 80% HR, 12-h alternadas de luz y oscuridad). Para implementar la fase experimental se seleccionaron únicamente plantas completamente sanas.

En noviembre de 2006 se recolectaron uredosporas a partir de hojas jóvenes infectadas en condiciones de campo en la Chacra Experimental Santa Rosa en Salta, Argentina. A efectos de la inoculación del material vegetal se preparó una suspensión en agua destilada estéril con una concentración de 10^4 ml⁻¹ uredosporas viables. A la suspensión, se le agregó unas gotas de detergente no-iónico (Tween 20) para romper la tensión superficial y, luego, se la aplicó en la superficie abaxial de las hojas utilizando un pincel. Las plantas inoculadas con la suspensión y las tratadas únicamente con agua (utilizadas como control) fueron mantenidas en un ambiente saturado de humedad y en completa oscuridad durante 24 h con la finalidad de promover la infección de los tejidos.

Diseño experimental y análisis de datos

Se realizaron cuatro experimentos para comparar la actividad peroxidasa en los materiales experimentales de las dos variedades utilizadas, a las 24, 48, 72 y 120 horas después de la inoculación (d.i.). Los ensayos consistieron de arreglos factoriales con dos factores: "Cultivares" y "Tratamientos de inoculación", utilizándose en todos los casos cuatro réplicas. Las plantas se distribuyeron en la cámara de cría siguiendo un diseño completamente aleatorio (DCA). Los datos fueron analizados con el programa

InfoStat Profesional (2007). También se efectuó un análisis factorial conjunto con la finalidad de integrar los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

Extractos vegetales

Se extrajeron las peroxidasas totales a partir de las láminas foliares. Se pesaron 0.5g de tejido fresco y se lo molió hasta obtener un polvo fino utilizando nitrógeno líquido. El polvo fue suspendido en 5 ml de una solución reguladora ácido cítrico 0.1M / fosfato de sodio 0.2 M, pH 5.2. Las muestras fueron homogeneizadas por 5 min a 65 rpm en un baño con hielo. Los extractos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de jeringa de nitrato de celulosa de 0.45 µm de tamaño de poro y almacenado hasta su evaluación para actividad peroxidasa dentro de las siguientes 24 horas.

Medición de la actividad enzimática

La actividad peroxidasa fue determinada "in-vitro" mediante el test de guayacol con modificaciones (Colowick and Kaplan, 1957). La reacción fue iniciada mediante el agregado de peróxido de hidrogeno y se midió la absorbancia a 470 nm debido a la formación de tetraguayacol (coeficiente de extinción: $26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 10 minutos con un espectrofotómetro GBC UV-Visible Cintra 101 (figura 1).

Con la finalidad de establecer las mejores condiciones para la evaluación de la actividad peroxidasa en caña de azúcar, se realizaron previamente una serie de ensayos para investigar los efectos del pH, temperatura, concentraciones de sustrato y enzima, y el tiempo de estabilidad de los extractos. El efecto del pH fue probado a 3.2, 4.2, 5.2, 6.2, 7.2 y 7.6, para lo cual se utilizó ácido cítrico 0.1M / fosfato de sodio 0.2M como solución reguladora. Las temperaturas de prueba utilizadas fueron 0, 40, 50, 60 y 70 °C. Las siguientes concentraciones de guayacol fueron experimentadas: 5, 10, 40, 80 y 120 mM utilizando una concentración fija de peróxido de hidrogeno, mientras que las concentraciones de peróxido de hidrogeno utilizadas fueron: 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 mM con una concentración fija de guayacol. Para determinar la estabilidad del extracto enzimático luego de su extracción, su actividad fue medida a 2, 4, 6, 8, 10 y 24 h de la extracción de los tejidos frescos.

Actividad enzimática en los ensayos caña de azúcar-roya marrón

La actividad fue medida en un volumen de reacción de 2.4 mL conteniendo: 2 mL de solución reguladora ácido cítrico 0.1 M / fosfato sódico 0.2 M pH 5.2, 0.2 mL de extracto enzimático diluido, 0.1 mL de guayacol 40 mM. La evaluación fue realizada a 50 °C. La reacción fue iniciada mediante el agregado de 0.1 mL de peróxido de hidrogeno 15 mM y la formación de tetraguayacol fue registrada durante 10 minutos. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que puede catalizar

la producción de 1 μ mol de tetraguayacol, por minuto por gramo de tejido fresco (U/g). Las curvas de progreso de la reacción y sus pendientes, que se utilizaron para calcular la actividad peroxidasa, fueron obtenidas y procesadas con el programa GraphPad Prism 4.00.

Concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método Micro Bradford (Krueger, 2002) utilizando suero de albumina bovina como estándar.

RESULTADOS

Evolución temporal de la actividad peroxidasa

La figura 1 muestra la evolución de la actividad peroxidasa medida en diferentes momentos con posterioridad a la inoculación. Con la finalidad de eliminar cualquier efecto de un posible estrés sobre la actividad peroxidasa inducido por el período de oscuridad completa durante las primeras 24 horas posteriores a la inoculación, los datos crudos correspondientes a las plantas infectadas fueron corregidos mediante la substracción de la actividad peroxidasa promedio de los testigos a las 48, 72 y 120 horas tal como sugiere Moerschbacher *et al.* 1988.

En ambos cultivares la actividad peroxidasa se incrementó a las 48 h con el tratamiento de inoculación y alcan-

zó, en el caso de R570, un valor máximo a las 72 h que declinó posteriormente. En el cultivar susceptible, NA86-2280, la actividad peroxidasa mostró un comportamiento errático que tuvo una depresión a las 72 h y alcanzó su valor máximo a las 120 h posteriores a la infección.

Se encontraron diferencias significativas en la actividad peroxidasa en ambos cultivares al comparar plantas inoculadas con sus controles sin inocular a las 48, 72 y 120 horas posteriores a la inoculación. La mayor diferencia entre las plantas inoculadas y los controles se manifestó a las 72 horas (diferencia de 1,58 U/g). Los resultados del análisis ANOVA se presentan en la tabla 1, en sus versiones de un análisis factorial con tres factores y dos análisis complementarios de comparaciones ortogonales. Las últimas, fueron realizadas para establecer diferencias entre cultivares y tratamientos de inoculación en cada nivel de tiempo transcurrido posterior a la inoculación. El análisis conjunto muestra diferencias significativas para cada uno de los tres factores principales (entre variedades, tratamientos de inoculación y tiempo transcurrido) en el promedio de los otros factores evaluados, aunque no pudieron detectarse efectos significativos de las interacciones. Los análisis complementarios basados en las comparaciones ortogonales, en cambio, detectaron diferencias significativas entre las variedades a las 72 horas posteriores a la inoculación y entre los tratamientos de inoculación a las 48, 72 y 120 horas después de la inoculación.

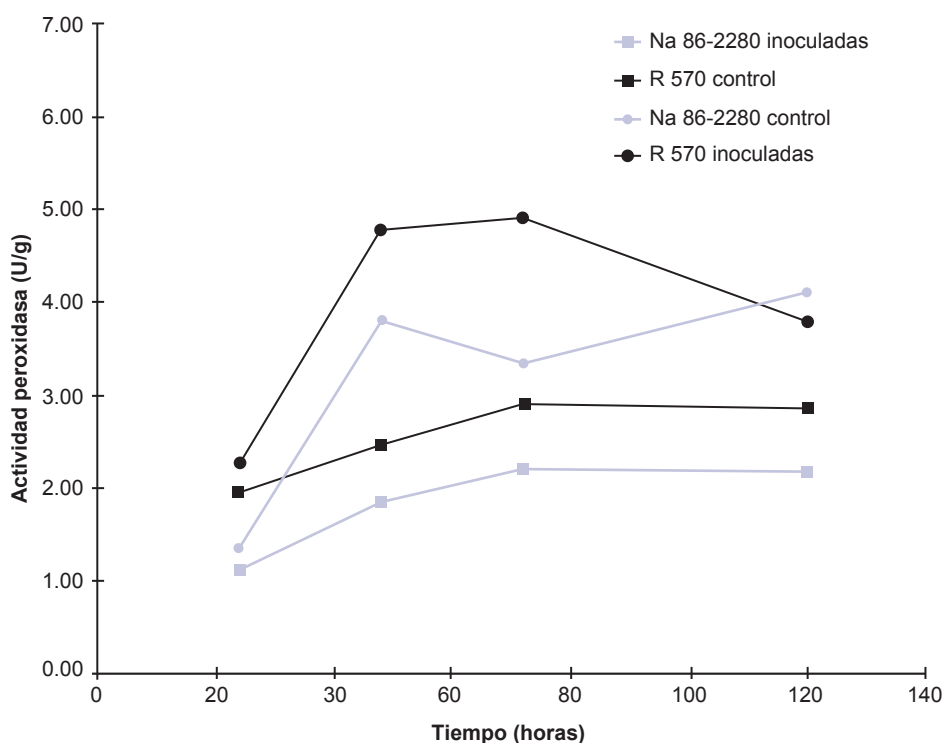


Figura 1. Evolución de la actividad peroxidasa en extractos de hojas de los cultivares R 570 y NA 80-2280 en materiales inoculados y no inoculados con *P. melanocephala*. (Datos corregidos por efecto de estrés lumínico).

La tabla 2 muestra las medias y la significación de sus diferencias para variedades, tratamientos de inoculación, tiempo transcurrido con posterioridad a la inoculación y las intersecciones entre los dos primeros y el último. En el promedio la variedad resistente, R570 presentó una mayor actividad peroxidasa cuando se compara con la susceptible NA86-2280. Dicha diferencia asciende a 0,74 (U/g).

En cada nivel del tiempo transcurrido posterior a la inoculación, la significación estadística de las diferencias solamente pudo confirmarse a las 72 horas, aunque todavía presenta significado biológico a las 24 y 48 horas (1,14; 0,85 y 0,79 U/g, respectivamente). La naturaleza y la extensión de estos ensayos con un limitado número de réplicas no permitieron la detección de significaciones estadísticas en estos casos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La actividad peroxidasa en los cultivares de caña de azúcar investigados, incrementa a partir de las 48 h posterior-

C.V.	SS	dF	MS
Variedades (V)	6,54	1	6.54*
Inoculación (I)	21,97	1	21.97**
Horas d.i. (H)	23,12	3	7.71**
Int. VxI	0.02	1	0.02 ^{ns}
Int. VxH	1.51	3	0.51 ^{ns}
Int. IxH	5.62	3	1.90 ^{ns}
Int. VxIxH	1.5	3	0.50 ^{ns}
Error	31.61	31	0,99
Variedades d. de Horas	8.06	4	2.01 ^{ns}
24 h	2.18	1	2.18 ^{ns}
48 h	1.85	1	1.85 ^{ns}
72 h	3.94	1	3.94*
120 h	0.09	1	0.09 ^{ns}
Inoculación d. de Horas	27.59	4	6.89**
24 h	0.2	1	0.20 ^{ns}
48 h	13.76	1	13.76**
72 h	7.54	1	7.54**
120 h	6.09	1	6.09*

Tabla 1. Actividad peroxidasa en caña de azúcar. Análisis triple factorial de la varianza y comparaciones ortogonales entre variedades y tratamientos de inoculación en diferentes niveles de tiempos después de la inoculación.

res a la inoculación y alcanzó un máximo a las 72 h en el caso de la variedad resistente R570 y a las 120 h en el caso de la variedad susceptible NA86-2280. El incremento de la actividad peroxidasa a las 48 horas después de la infección, puede deberse a la percepción de la señal de infección ya que se inició la respuesta de la planta.

Los resultados sugieren que además de la actividad peroxidasa basal en las variedades, el incremento de su actividad, después de la inoculación, pueden ser mecanismos complementarios importantes que contribuyen a la determinación de la resistencia genética a la roya marrón en la caña de azúcar. Campos *et al.* (2004), encontraron que en los electroferogramas de extractos enzimáticos de plantas de porotos (*Phaseolus vulgaris* L) inoculadas con *Colletotrichum lindemuthianum* Briosi & Cavara, aparece una banda diferente en los cultivares resistentes con tratamientos de inoculación cuando se comparan con los materiales no inoculados, lo que sugiere la inducción de isoformas de peroxidasa en respuesta a la infección. Por otra parte, todas las plantas inoculadas presentaron actividades incrementadas tanto de peroxidasa como de polifenol oxidasas respecto de los controles, determinándose mayores actividades enzimáticas en cultivares con mayor niveles de resistencia a la enfermedad. Ramos Leal *et al.* (1982), encontraron diferentes isoenzimas peroxidasa relacionadas con dos líneas isogénicas que diferían en su susceptibilidad a la roya de la hoja producida por *Puccinia recóndita* Dietel and Holw. La diferencia de la actividad peroxidasa en los materiales resistentes y susceptibles estuvo relacionada por la ocurrencia de diferentes isoenzimas peroxidasa. Estos resultados muestran una similitud con la circunstancia referida de que el cultivar resistente R570 muestra una respuesta más temprana a la infección con *Puccinia melanocephala* en este trabajo.

Además del incremento en la actividad de las peroxidasa, se demostró que la inducción de la expresión de genes de peroxidasa, es decir, la inducción de la síntesis

Horas después de inoculación	24 h	48 h	72 h	120 h	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					
Control	1.54 ^a	2.53 ^a	2.56 ^a	2.53 ^a	2.20 ^a
Inoculado	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 2. Actividad Peroxidasa en caña de azúcar. Medias en unidades de actividad (U/g) y significación de las diferencias entre variedades y tratamientos de Inoculación, a las diferentes horas d.i.

de peroxidases, tiene impacto en la resistencia a fitopatógenos. Johrde y Scheweizer (2008), encontraron que la sobre-expresión transitoria de un gen de peroxidasa estimula significativamente la resistencia a la penetración en células de cebada (*Hordeum vulgare*) transformadas contra *Blumeria graminis* sp. Hordei. Esto se ve reflejado por un índice de susceptibilidad reducido que corresponde a la tasa relativa de células que contienen haustorios GUS (gen glucoronidasa), por lo que contribuiría a la resistencia basal de la cebada a éste fitopatógeno. Estos resultados coinciden con lo que ya había sido mostrado por Fink *et al.* (1991), quienes encontraron que la lignificación extracelular mediada por peroxidases y polifenol oxidasas estaría involucrada en los mecanismos tempranos de resistencia del “no-hospedante” frente a la roya en avena. Las modificaciones de la pared celular que conducen a un incremento de la resistencia mecánica, pueden demorar el desarrollo del hongo y permitió la formación de mecanismos de defensa por la planta. Puede sugerirse que la reacción de la actividad peroxidasa en la variedad resistente R570 tendría una similitud con los mecanismos de “no-hospedante” informada por estos autores.

Además de estos antecedentes, la relación entre las peroxidases, los compuestos fenólicos y la “explosión oxidativa” parece ser de una complejidad aún mayor. Arencibia *et al.* (2008, 2010), mostraron que la presencia en el medio del cultivo de fenilpropanoles y peróxido de hidrógeno, ambos sustratos de las peroxidases, pueden inducir genes relacionados con defensas de las plantas y, también, las vías asociadas a la generación de la cascada oxidativa.

Debido a que las diferencias entre las actividades enzimáticas detectadas entre los cultivares de caña de azúcar muestran estabilidad en los diferentes ensayos, puede inferirse la ocurrencia de una diferencia constitutiva (“basal”) en la actividad de la enzima. Es posible que las diferencias puedan explicar, al menos en parte, las diferencias en la resistencia a la roya marrón en estos cultivares. Los niveles de actividad peroxidasa definidos en los genotipos podrían, consecuentemente, ser uno de los mecanismos que contribuyen a la resistencia a la enfermedad en la caña de azúcar. Esto puede ser de importancia a la hora de identificar tempranamente genotipos resistentes a la roya marrón aún en ausencia de la enfermedad y sin necesidad de proceder a inoculación inducida.

Se propone que ambos mecanismos: la actividad peroxidasa basal determinada en los genotipos y la velocidad de la respuesta a la infección que incrementó la actividad peroxidasa como respuesta de la planta, son mecanismos complementarios que contribuyen a la resistencia de la caña de azúcar a la roya marrón *P. melanocephala*.

La evaluación y medición de la actividad peroxidasa también podría servir al propósito de identificar determinantes de resistencias específicas (en el supuesto de la ocurrencia de razas fisiológicas de la enfermedad) como así marcadores genéticos y moleculares de resistencia a roya marrón, ya que para esto es indispensable que la información de ligamiento o asociación entre el marcador molecular y el carác-

ter fenotípico tenga el máximo grado de confiabilidad. Mediante un procedimiento relativamente sencillo se podrían identificar genotipos resistentes a roya, aún en ausencia del patógeno (en el caso de la actividad peroxidasa basal), que al asociarse a marcadores moleculares permitirían que el procedimiento pueda ser aplicado ventajosamente en programas de mejora genética de este cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y al Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta por el financiamiento de esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

ARENCEBIA, A.D.; BERNAL, A.; YANG, L.; CORTEGAZA, L.; CARMONA, E.R.; PEREZ, A.; HU, C.J.; LI, Y.R.; ZAYAS, C.M.; SANTANA, I. 2008. New role of phenylpropanoid compounds during sugarcane micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Science* 75, 487–496.

ARENCEBIA, A.D.; BERNAL, A.; ZAYAS, C.; CARMONA, E.; CORDERO, C.; GONZÁLEZ, G.; GARCÍA, R.; SANTANA, I. 2010. Hydrogen peroxide induced phenylpropanoids pathway eliciting a defensive response in plants micropropagated in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Science* 195, 71–79.

ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; ROTT, P. 2001. Resistance of sugarcane cultivar R570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. *Plant Disease* 85, 282–286.

ASNAGHI, C.; ROQUES, D.; RUFFEL, S.; KAYE, C.; HOARAU, J.Y.; TÉLISMART, H.; GIRARD, J.C.; RABOIN, L.M.; RISTERUCI, 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.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; VOZARÍ HAMPE, M.M.; FERREIRA ANTUNES, I.; BRANÇÃO, N.; DA SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. 2004. Actividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa agropecuaria brasileira*, 39, 637–643.

COLOWICK, P.; KAPLAN, J. THE GUAIACOL TEST. En: COLOWICK, P.; KAPLAN, J. (Eds.). *Methods in enzymology*. New York, Academic Press 1957.p.775.

DAUGROIS, J.H.; GRIVET, L.; ROQUES, D.; HOARAU, J.Y.; LOMBARD, H.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. 1996. A putative major gene for rust resistance linked with an AFLP marker in sugarcane cultivar R 570. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 1059–1064.

DELANNOY, E.; JALLOUL, A.; ASSIGBETSÉ, K.; MARMEY, P.; GEIGER, J.P.; LHERMINIER, J.; DANIEL, J.F.; MARTINEZ, C.; NICOLE, M. 2003. Activity of Class III Peroxidases in the Defense of Cotton to Bacterial Blight. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (11), 1030–1038.

DI RIENZO J.A.; CASANOVES F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA M. & C.W.R. 2011 InfoStat versión 2007. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En: <http://www.infostat.com.ar>.

DÍAZ-VIVANCOS, P.; RUBIO, M.; MESONERO, V.; PERIAGO, P.M.; ROS BARCELÓ, A.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; HERNÁNDEZ,

- J.A. 2006. The apoplastic antioxidant system in Prunus: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57, 3813–3824.
- FINK, W.; HAUG, M.; DEISING, H.; MENDGEN, K. 1991. Early defense responses of cowpea (*Vigna sinensis* L.) induced by non pathogenic rust fungi. *Planta* 185, 246–254. GraphPad Prism version 4.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA. En: www.graphpad.com
- JOHNSON, L.B.; CUNNINGHAM, B.A. 1972. Peroxidase activity in healthy and leaf-rust-infected wheat leaves. *Phytochemistry* 11, 547–551.
- JOHRDE, A.; SCHWEIZER, P. 2008. A class III peroxidase specifically expressed in pathogen-attacked barley epidermis contributes to basal resistance. *Molecular Plant Pathology* 9 (5), 687–696.
- KRUEGER, N.J. The Bradford Method for Protein Quantification. En: J. M. WALKER and Totowa, N. J (Eds.). *The Protein Protocols Handbook* (2nd Edition). Humana Press Inc., New Jersey 2002. pp.15-22.
- LAGRIMINI, M.L.; ROTHSTEIN, S. 1987. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* 84, 438–442.
- LAVANIA, M.; CHAUHAN, P.S.; CHAUHAN, S.V.S.; SINGH, H.B.; NAUTIYAL, C.S. 2006. Induction of plant defence enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens*. NBRI1213. *Current Microbiology* 52, 363–368.
- LUHOVÁ, L.; LEBEDA, A.; HEDEROVÁ, D.; PĚC, P. 2003. Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* under different light conditions. *Plant Soil and Environment* 49, 151–157.
- MLIČKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; LEBEDA, A.; MIESLEROVÁ, B.; PĚC, P. 2004. Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 753-761
- MOERSCHBACHER, B.M.; NOLI, U.M.; FLOTT, B.E.; REISNER, H.J. 1988. Lignin biosynthesis enzymes in stem rust infected, resistant and susceptible near-isogenic wheat lines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33, 33-46.
- PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24, 255-256.
- PIPERIDIS, G.; D'HONT, A. 2001. Chromosome composition analysis of various *Saccharum* interspecific hybrids by genomic *in situ* hybridisation (GISH). *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists Congress* 24, 565.
- RAGO, A.M. Variabilidade Patogênica de *Puccinia melanocephala* e *Ustilago scitaminea* no estado de São Paulo 2005. Thesis (MSc.) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo. 43p
- RAMDOYAL, K.; SULLIVAN, S.; LIM SHIN CHONG, L.C.Y.; BADALOO, G.H.; SAUMTALLY, S.; DOMAINGUE, R. 2000. The genetics of rust resistance in sugar cane seedling populations. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 557–563.
- RAMOS LEAL, M.; RUIZ, A.; SANDOVAL, I.; MARIBONA, R.H. 1989. Biochemical Evaluation of Fungal Disease Resistance in Sugarcane. *Plant Breeding* 102, 45–50.
- SASAKI, K.; IWAI, T.; HIRAGA, S.; KURODA, K.; SEO, S.; MITSUHARA, I.; MIYASAKA, A.; IWANO, M.; ITO, H.; MATSUI, H.; OHASHI, Y. 2004. Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. *Plant Cell Physiology* 45, 1442–1452.
- SASAKI, K.; YUICHI, O.; HIRAGA, S.; GOTOH, Y.; SEO, S.; MITSUHARA, I.; ITO, H.; MATSUI, H.; OHASHI, Y. 2007. Characterization of two rice peroxidase promoters that respond to blast fungus infection. *Molecular Genetics Genomics* 278, 709–722.
- TOGNOLLI, M.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; SIMON, P. 2002. Analysis and expression of the Class III peroxidase large family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288, 129-138.
- VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. 2006. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135–162.
- WELINDER, K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2, 388–393.
- YOUNG, S.A.; GUO, A.; GUIKEMA, J.A.; WHITE, F.F.; LEACH, J.E. 1995. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Physiology* 107, 1333–1341