

## Nota técnica

## Expresión de la enzima peroxidasa en plantas de *Saccharum* sp. híbrido inoculadas con *Xanthomonas albilineans* Ashby (Dowson)

### Expression of the peroxidase enzyme in hybrid *Saccharum* sp. plants inoculated with *Xanthomonas albilineans* Ashby (Dowson)

Madyu Matos-Trujillo<sup>1</sup>, Maykelis Díaz-Solares<sup>2</sup>, Luz María Samaniego-Fernández<sup>1</sup>, Leydis Cortegaza-Ávila<sup>3</sup>, José R. Pérez-Milian<sup>3</sup>, Yenima Pellón-Guzmán<sup>3</sup>, Yordanka Rufin-Hernández<sup>3</sup> y Josel Pérez-Pérez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas, Autopista a Varadero km 3, Matanzas, Cuba

<sup>2</sup>Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Matanzas, Cuba

<sup>3</sup>Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Antonio Mesa, Matanzas, Cuba

Correo electrónico: madyu.matos@umcc.cu

#### Resumen

En este estudio se evaluó la expresión de la enzima peroxidasa (POX) en dos cultivares de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) y la correlación con la respuesta de cada uno ante la invasión del patógeno *Xanthomonas albilineans*, su agente causal. Los cultivares evaluados fueron Mayarí 55-14 (tolerante) y Cuba 85-102 (susceptible); ambos se inocularon a los cinco meses de edad con la bacteria, y los controles, con el tampón fosfato de sodio. Se utilizó un diseño totalmente aleatorizado, con tres réplicas. A los datos se les realizó análisis de varianza (ANOVA), mediante el paquete estadístico Stargraphic plus versión 5.1. En ambos cultivares la actividad específica POX se incrementó después de la inoculación con la bacteria; en el My55-14 fue superior respecto al C85-102 a partir de dos horas. La respuesta a la infección del patógeno se detectó más rápido en el cultivar tolerante (2 horas) que en el susceptible (4 horas). Se concluye que la actividad peroxidasa está involucrada en los procesos de defensa de la caña de azúcar contra la bacteria *X. albilineans*; de ahí que se pueda utilizar, por su importancia, en la identificación de genotipos resistentes a este patógeno, en el marco de los programas de mejoramiento de esta planta, con vistas a garantizar la obtención de biomasa de mayor calidad, tanto para la industria azucarera como para la alimentación animal.

Palabras clave: actividad enzimática, organismos patógenos, resistencia a la enfermedad.

#### Abstract

In this study the expression of the peroxidase enzyme (POX) in two sugarcane cultivars (hybrid *Saccharum* sp.) and the correlation with the response of each one to the invasion of the pathogen *Xanthomonas albilineans*, its causative agent, were evaluated. The evaluated cultivars were Mayarí 55-14 (tolerant) and Cuba 85-102 (susceptible); they were both inoculated at five months of age with the bacteria, and the controls, with sodium phosphate buffer. A completely randomized design, with three replications was used. Variance analysis (ANOVA) was performed on the data, through the statistical package Statgraphics plus version 5.1. In both cultivars the POX specific activity increased after the inoculation with the bacteria; in My55-14 it was higher with regards to C85-102 since two hours. The response to the pathogen infection was detected faster in the tolerant cultivar (2 hours) than in the susceptible one (4 hours). It is concluded that the peroxidase activity is involved in the defense processes of sugarcane against the bacteria *X. albilineans*; hence it can be used, because of its importance, in the identification of resistant genotypes to this pathogen, in the framework of the breeding programs of this plant, in order to guarantee obtaining higher quality biomass, for the sugar industry as well as for animal feeding.

Keywords: enzymatic activity, pathogen organisms, resistance to disease

#### Introducción

*Saccharum* sp. híbrido es uno de los cultivos que se utilizan en la alimentación ganadera, debido a su valor forrajero, a que su volumen de producción de biomasa es mayor que el de otras poáceas y a que la cosecha se realiza en la época de seca (Hernández *et al.*, 2004), cuando hay más escasez de alimento para los animales.

Uno de los factores que influyen notablemente en el rendimiento y, por tanto, en la calidad de la biomasa de la caña de azúcar es la notable incidencia de plagas. La enfermedad escaldadura foliar, causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* Ashby (Dowson), en su fase aguda, ha provocado pérdidas de más del 90 %, debido a la reducción en la calidad y cantidad de los jugos (Huerta-Lara *et al.*, 2009).

Entre los cambios bioquímicos que ocurren en la caña como consecuencia de la invasión por *X. albilineans* se destaca la síntesis de moléculas, como los polisacáridos (Blanch *et al.*, 2008; Legaz *et al.*, 2011); la de compuestos fenólicos; y la de varios sistemas enzimáticos, como, por ejemplo, las peroxidases (Santiago *et al.*, 2009), las cuales actúan de forma combinada para evitar la diseminación del patógeno en la planta.

Las peroxidases vegetales (E.C.1.11.1.17), frecuentemente conocidas como peroxidases clase III, son enzimas monoméricas que intervienen en una amplia gama de procesos fisiológicos, tales como: la lignificación, la suberización, el metabolismo de las auxinas, el ensamblado de las proteínas de la pared celular, la tolerancia a sales, el estrés hídrico (Ajithkumar y Panneerselvam, 2014) y la defensa contra el ataque de patógenos (Van Loon *et al.*, 2006). Aparecen en los tejidos vegetales después de la infección por patógenos, y su expresión en plantas superiores puede ser inducida por bacterias (Legaz *et al.*, 2011), hongos (Machado-Assef *et al.*, 2013) y virus (Quistián y Valadez, 2011). De ahí que la identificación de marcadores, tanto bioquímicos como moleculares, puede resultar de gran valor en la identificación varietal (Arellano-Litardo *et al.*, 2012) y en la caracterización de genotipos en un programa de mejoramiento genético, ya que facilita la selección de resistencia a determinados patógenos (Sharma *et al.*, 2012).

En Cuba se han realizado varias investigaciones acerca de la interacción caña de azúcar-*X. albilineans* para la evaluación del comportamiento varietal; sin embargo, existe poca información sobre los cambios bioquímicos que tienen lugar en la planta como consecuencia de la invasión del patógeno, específicamente aquellos que se relacionan con el estrés oxidativo; así como acerca de la relación que pudiera existir entre estos y la tolerancia de un cultivar ante la enfermedad.

Teniendo en cuenta la importancia de este cultivo tanto en la producción de azúcar y otros derivados como en la alimentación animal, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de la enzima peroxidasa en dos cultivares de caña de azúcar y la correlación con la respuesta de cada uno ante la invasión del patógeno *X. albilineans*, su agente causal.

## Materiales y Métodos

**Obtención y caracterización de *X. albilineans*.** La bacteria *X. albilineans* se aisló a partir de plantas con síntomas de la enfermedad escaldadura foliar en el cultivar susceptible Louisiana 55-5

(L55-5), plantado en áreas de la Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Antonio Mesa (EPICA) en el municipio Jovellanos –Matanzas, Cuba.

Para ello se obtuvieron extractos vegetales que se sembraron en medio Wilbrink y se incubaron a 28 °C durante 5 días, y a las colonias resultantes se les realizaron las pruebas bioquímicas y serológicas pertinentes (siguiendo la metodología empleada por Matos, 2002), para comprobar la presencia de la bacteria *X. albilineans* y el serovar al que pertenecen. Para la descripción de las características morfológicas, se tuvieron en cuenta los indicadores tiempo de crecimiento, color y tamaño de las colonias. La identificación serológica se efectuó mediante la técnica de aglutinación en látex (Peralta *et al.*, 1997). La patogenicidad de las colonias se comprobó mediante inoculación artificial en plantas sanas de caña de azúcar del cultivar L55-5, de seis semanas de edad. Las plantas inoculadas se inspeccionaron diariamente y a los 15 días se realizó el reislamiento del patógeno en medio de cultivo Wilbrink, como se describió anteriormente.

La suspensión bacteriana utilizada como inóculo se obtuvo a partir del cultivo de las colonias en medio líquido Wilbrink, durante cinco días e incubadas a 37 °C. Las células se centrifugaron (5 000 rpm por 10 min. a 4 °C), se lavaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar los componentes del medio Wilbrink y se resuspendieron en el tampón fosfato de sodio (10 mmol L<sup>-1</sup> a pH 7,5).

**Siembra del experimento.** En el banco de semillas de la EPICA se colectaron estacas de plantas sin síntomas de los cultivares My55-14 y C85-102, que se informaron previamente como tolerante y susceptible a la enfermedad, respectivamente (Matos, 2002). Las estacas se fragmentaron en trozos que poseían una yema, a la que se le aplicó tratamiento hidrotérmico a 51 °C durante una hora, y después se plantaron en canteros de 1 x 3 m que tenían como sustrato suelo estéril y materia orgánica, en áreas del vivero de la EPICA. El experimento se sembró en el mes de noviembre, en un diseño totalmente aleatorizado con tres réplicas.

Las medias de las condiciones climatológicas durante la etapa experimental fueron las siguientes: temperatura-20,2 °C; humedad-78 %; precipitación- 9,5 mm; horas sol-7,6 h.

**Inoculación de las plantas de caña de azúcar y toma de muestras.** Se utilizaron cuatro tratamientos: plantas de cada cultivar que se inocularon con la suspensión bacteriana de *X. albilineans*, y con el

tampón fosfato de sodio (10 mmol L<sup>-1</sup>, solución base que se utilizó para la preparación de esa suspensión, con pH 7,5), estas últimas consideradas como testigos.

El método que se utilizó para la inoculación de las plantas de caña de azúcar, con y sin la bacteria, fue el de infiltración con jeringuilla, según Díaz (2000). La infiltración se efectuó en las hojas jóvenes de las plantas con cinco meses de edad.

Se tomaron muestras aleatorias de hojas de diferentes plantas inoculadas de cada variedad y de las testigos, antes de la infección (t = 0), y posterior a la infección a las 2, 4, 6, 24, 48, 72 horas; se tuvo en cuenta que la bacteria tiene un crecimiento lento y los síntomas de la enfermedad se observan días después de la infección, acorde con lo informado por Matos (2002).

Las muestras se tomaron por duplicado según los tiempos señalados, se sumergieron en nitrógeno líquido, y posteriormente se conservaron a -20 °C, hasta su procesamiento en el laboratorio.

**Obtención de los extractos.** Se pesó 1 g de hojas sin la nervadura central, se maceró y homogenizó con 2 mL de tampón fosfato de sodio (0,1 mmol L<sup>-1</sup>, a pH 7,5). Se centrifugó a 7 000 rpm y a 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para realizar determinaciones de la actividad enzimática. El extracto de proteínas se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### Determinación de la actividad peroxidasa.

La actividad peroxidasa se determinó por el método continuo. Se utilizaron como sustratos el guayacol (0,018 M) y el peróxido de hidrógeno (30 %, ajustando la A<sub>240 nm</sub> a 0,4 contra agua destilada). Se determinó la velocidad de la oxidación del guayacol por la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno, durante cinco minutos, y se midió la absorbancia a 436 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro UV/visible. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que puede catalizar la producción de 1 µmol por minuto por mililitro de enz<sup>-1</sup>.

En tanto, la concentración de proteínas se analizó por el método de Lowry *et al.* (1951), y se realizó la lectura de la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2100 proUV/visible, para lo cual se confeccionó una curva patrón de albúmina bovina (BSA) a partir de una solución madre de 1 mg mL<sup>-1</sup>. La actividad específica de la enzima peroxidasa se determinó según la expresión:

Actividad específica = actividad enzimática / concentración de proteínas

**Procesamiento de los datos.** Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANO-

VA) de clasificación simple, y las medias fueron comparadas mediante la d<sup>o</sup>cima de Duncan (1955) para un 5 % de significación, después de verificarse que cumplieran con la normalidad –prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov– y la homogeneidad de varianza –prueba de Bartlett–. Los indicadores que no cumplieron con los mencionados supuestos fueron comparados a través de la prueba de Kruskal-Wallis y las medias se contrastaron a través de la prueba de rangos múltiples de Student-Newman-Kwels (SNK), para un 5 % de significación. Todo ello con el paquete estadístico Statgraphic plus versión 5.1 sobre Windows®.

## Resultados y Discusión

Las cepas de *X. albilineans* obtenidas a partir de plantas con síntomas de la escaldadura foliar en el cultivar L55-5 coincidieron con las características informadas en la literatura para el género y la especie, lo cual se corroboró a través de las evaluaciones morfológicas, bioquímicas y serológicas antes descritas (fig. 1).

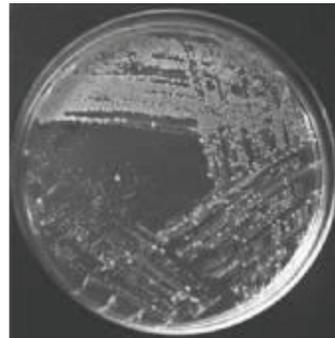


Figura 1. Colonias típicas de la bacteria *X. albilineans*.

En la comprobación de la patogenicidad de la cepa aislada se logró la reproducción de los síntomas de escaldadura foliar en el cultivar L55-5, lo cual demostró el poder patogénico de los aislados obtenidos. En todos los casos se reisoló la bacteria *X. albilineans* y a través de la aglutinación en látex se confirmó que los aislados pertenecían al serovar I informado con anterioridad (Matos, 2002).

Las bacterias fitopatógenas, en el momento de contacto con la planta, ponen en marcha un grupo amplio de reacciones contra el hospedante que contribuyen al éxito de la invasión final (Ryan *et al.* 2011). Entre los mecanismos inducidos por la planta ante la infección se encuentra el estallido oxidativo, que tiene como objetivo detener la infección y la

síntesis de compuestos que están involucrados con la restricción del microorganismo invasor al área de penetración (Sharma *et al.*, 2012), como, por ejemplo, la enzima peroxidasa, que ha sido evaluada en tejidos infectados, generalmente, después de daños o infección con incrementos en su actividad (Machado-Assefh *et al.*, 2013).

En la figura 2 se observan los resultados de la actividad POX en los cultivares estudiados. Ambos alcanzaron valores constitutivos de la enzima, representados por el control ( $t = 0$ ); estos valores basales corresponden a la actividad metabólica de la planta en condiciones normales. En el cultivar tolerante My 55-14 la actividad POX comenzó a aumentar después de la inoculación, por lo que se alcanzaron las cifras más altas de la actividad específica a las 4 horas, lo cual coincide con lo esperado, ya que el cultivar tolerante es capaz de tener una mayor respuesta ante la invasión del patógeno (Santiago *et al.*, 2009).

En el cultivar susceptible C85-102, contrariamente, la actividad POX disminuyó a las 2 horas posteriores de la inoculación con respecto al valor de la actividad de la enzima a  $t = 0$ . A las 4 horas se observó el mayor incremento de la actividad específica de la enzima, en comparación con el tiempo anterior y los posteriores, aunque fue más baja en el cultivar tolerante.

De forma general, la actividad POX en las plantas infectadas experimentó un incremento como respuesta al estrés biótico, lo que indica que la maqui-

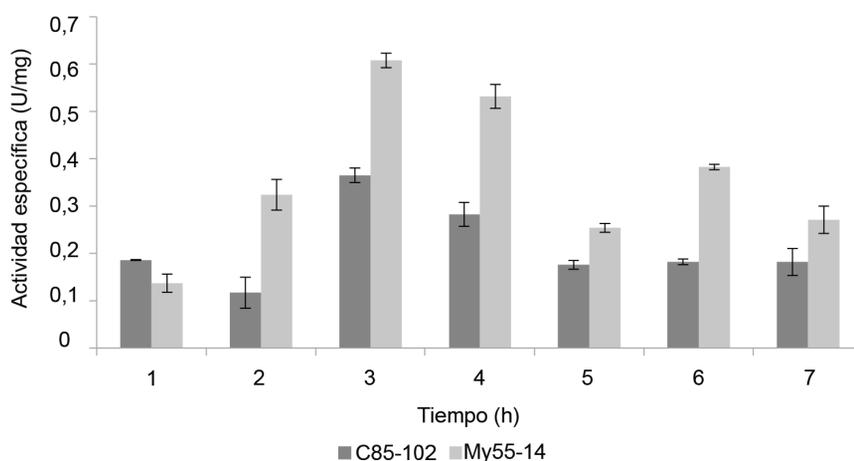
naria responsable de la eliminación de  $H_2O_2$  no sufrió ningún daño como consecuencia del estrés. Por su parte, el cultivar tolerante presentó una activación más intensa y temprana después de la infección que el susceptible. Tales resultados indican que la acumulación de este catalizador no está restringida únicamente a las plantas tolerantes, sino que también se puede detectar en interacciones susceptibles; sin embargo, en estos casos, pueden diferir en cuanto al tiempo de aparición e intensidad de la actividad (Bülow *et al.*, 2004).

El estudio de la actividad enzimática también permitió que se observara una cierta capacidad de detoxificación de  $H_2O_2$  en las plantas infectadas respecto a las plantas control. El incremento de la actividad específica coincide con el proceso de penetración del patógeno, el cual demora entre 4 y 36 horas después de la inoculación; así como con la alta coordinación entre las diferentes vías de señalización en caña de azúcar, como respuesta a distintos tipos de estrés (Damaj *et al.*, 2005).

La tabla 1 muestra los valores de la actividad POX en función del cultivar y el tratamiento.

En ambos cultivares hubo un incremento de la actividad POX después de la inoculación con el patógeno; sin embargo, el cultivar tolerante My 55-14 difirió significativamente en relación con el testigo y el cultivar susceptible. Es posible que tales diferencias puedan explicar la resistencia a la enfermedad en estos cultivares.

Los resultados demostraron la importancia de la enzima peroxidasa en la respuesta defensiva de la



Las barras verticales representan el error estándar para  $p \leq 0,05$ .

Figura 2. Actividad específica de la enzima peroxidasa en hojas de los cultivares de caña de azúcar evaluados, después de la inoculación con la bacteria *X. albilineans*.

Tabla 1. Resultados de la actividad específica POX.

Cultivar	Tratamiento	Media	SD
My 55-14	Testigo	0,246 <sup>b</sup>	0,072
	Inoculadas	0,470 <sup>a</sup>	0,258
C85-102	Testigo	0,172 <sup>b</sup>	0,035
	Inoculadas	0,254 <sup>b</sup>	0,134

Los valores muestran la media para  $p \leq 0,05$ .

planta, al desempeñar su papel protector en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno en extractos de hojas (Díaz *et al.*, 2010); así como su utilidad para la selección del grado de tolerancia de los cultivares de caña de azúcar a la escaldadura foliar.

Otros autores han informado resultados similares acerca de la expresión de la enzima peroxidasa y la tolerancia a enfermedades. Santiago *et al.* (2009) correlacionaron la actividad específica POX y otros sistemas enzimáticos en discos de hojas de dos cultivares de caña de azúcar: My55-14 (tolerante) y L55-5 (susceptible), con diferentes fracciones de elicitores obtenidos a partir de *X. albilineans*. El cultivar tolerante My55-14 mostró una elevada actividad POX, en comparación con L55-5. Todas las fracciones de elicitores incrementaron la actividad de la enzima respecto al control en ambos cultivares; sin embargo, el valor de actividad específica de la enzima fue superior en el cultivar tolerante, posiblemente para reforzar las paredes celulares.

Machado-Assefh *et al.* (2013) reportaron resultados análogos, al evaluar la actividad peroxidasa y su posible relación con la resistencia o la susceptibilidad de cultivares de caña de azúcar a la roya marrón causada por *Puccinia melanocephala* H. Sydow & P. Sydow, la cual aumentó después de la inoculación en ambos cultivares, pero con mayor rapidez en el resistente. Las diferencias en la actividad de la enzima se hallaron entre cultivares y también entre las plantas inoculadas y los controles. Ello indica que el incremento de la actividad y expresión de genes de peroxidasa podría estar relacionado con la resistencia a fitopatógenos, y ha sido informado por diferentes autores en plantas sometidas a estrés bióticos: *Solanum lycopersicum* L. (Cerón, 2000), *Cicer arietinum* L. (García-Limones *et al.*, 2002), *Capsicum annum* L. (Do *et al.*, 2003), *Bouieloua dactyloides* (Nutt.) Columbus (Gulsen *et al.*, 2010) y *Panicum virgatum* L. (Saathoff *et al.*, 2013).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la planta, como respuesta de defensa en las interacciones planta-patógeno, induce la expresión de genes relacionados con las defensas de las plantas, las vías asociadas a la generación de

la cascada oxidativa (Sofo *et al.*, 2015) y otros sistemas protectores celulares endógenos del hospedero, todo lo cual limita el tamaño de la lesión (Montoliu, 2010). El incremento de la actividad peroxidasa, como consecuencia del incremento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas, podría actuar como un catalizador en la polimerización de compuestos fenólicos para la formación de lignina y suberina en la pared celular, que actúa como barrera para bloquear la diseminación del patógeno en la planta (Santiago *et al.*, 2009).

De los resultados descritos, se concluye que la evaluación de la actividad peroxidasa se puede utilizar, por su importancia, en la identificación de genotipos resistentes de caña de azúcar a la escaldadura foliar, en el marco de los programas de mejoramiento, con vistas a garantizar la obtención de biomasa de mayor calidad, tanto para la industria azucarera como para la alimentación animal. Por tanto, se recomienda evaluar este sistema enzimático en la selección de cultivares de caña de azúcar ante esta enfermedad.

## Referencias bibliográficas

- Ajithkumar, I. P. & Panneerselvam, R. ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth under drought stress. *Cell Biochem. Biophys.* 68 (3):587-595, 2014.
- Arellano-Litardo, Ana C.; Ramos-Leal, M.; Loo-Márquez, Zaida; Cabanilla-Guamán, Leyddi; Borisovna, Sofia & Pincay-Flores, A. Identificación de cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) mediante el empleo de isoenzimas peroxidasa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 43 (3):7-15, 2012.
- Blanch, María I.; Legaz, María E. & Vicente, C. Xanthan production by *Xanthomonas albilineans* infecting sugarcane stalks. *J. Plant Physiol.* 165 (4):366-374, 2008.
- Bülöw, L.; Schindler, M.; Choi, C. & Hehl, R. PathoPlant®: A database on plant-pathogen interactions in silico biology. *In. Silico Biol.* 4 (4):529-536, 2004.
- Cerón, Laura E. *Determinación y análisis comparativo de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) de los espacios intercelulares de plantas de tomate resistente (Lycopersicon esculentum ceraciforme) y sus-*

- ceptible (*Lycopersicon esculentum* Mill) antes y después de la infección con *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Trabajo de grado. Bogotá: Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, 2000.
- Damaj, M.; Beremand, P. P.; Al-Douri, A. F.; Silva, M. A.; Jifon, J. L.; Kumpatla, S. P. *et al.* Coordinated defense responses in sugarcane revealed by transcriptional profiling. *Abstracts of the Plant-Pathogen Interaction Workshop. Plant & Animal Genomes XIII Conference. W158: Intl. Consortium for Sugarcane Biotech. (ICSB)*. San Diego, USA, 2005.
- Díaz, Maricela. *Escaldadura foliar de la caña de azúcar en Cuba: Caracterización, diversidad y diagnóstico molecular de su agente causal (Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson)*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. San José de las Lajas, Cuba: Universidad Agraria de La Habana, 2000.
- Díaz, Maykelis; Pérez, Y.; Cazaña, Yanet; Prieto, Marlene; Wencomo, Hilda B. & Lugo, Yudith. Determinación de antioxidantes enzimáticos en variedades e híbridos de *Morus alba*. *Pastos y Forrajes*. 33 (3):301-310, 2010.
- Do, H. M.; Hong, J. K. Jung, H. W.; Kim, S. H. & Hwang, B. K. Expression of peroxidase-like genes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in *Capsicum annuum* bundle. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16 (3):196-205, 2003.
- Duncan, D. B. Multiple ranges and multiple F test. *Biometrics*. 11 (1):1-42, 1955.
- García-Limones, Carmen; Hervás, Ana; Navas-cortés, J. A.; Jiménez-Díaz, R. M. & Tena, M. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61 (6):325-337, 2002.
- Gulsen, O.; Eickhoff, K. T.; Heng-Moss, Tiffany; Shearman, R.; Baxendale, F.; Sarath, G. *et al.* Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turfgrasses challenged by *Blissus occiduus*. *Arthropod. Plant Interact.* 4 (1):45-55, 2010.
- Hernández, Marta; Simón, L. & Sánchez, Saray. Rendimiento forrajero de la caña de azúcar asociada a leguminosas arbóreas. I. Primer año de evaluación. *Pastos y Forrajes*. 27 (1):51-54, 2004.
- Huerta-Lara, M.; Rojas-Martínez, Reina I.; Bautista-Calles, Juliana; Reyes-López, D.; Becerril-Herrera, M.; Romero-Arenas, O. *et al.* Genetic and pathogenic diversity of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, in Mexico. *Res. J. Biol. Sci.* 4 (3):312-319, 2009.
- Legaz, M. E.; Blanch, M.; Piñón, Dolores; Santiago, R.; Fontaniella, B.; Blanco, Y. *et al.* Sugarcane glycoproteins may act as signals for the production of xanthan in the plant-associated bacterium *Xanthomonas albilineans*. *Plant Signal Behav.* 6 (8):1132-1139, 2011.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1):265-275, 1951.
- Machado-Assef, C. R.; Collavino, N. G.; Daz, M.; Poci, M. I. & Mariotti, J. La actividad peroxidada 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 and P Sydow). *RIA*. 39 (2):169-175, 2013.
- Matos, Madyu. *Evaluación de la presencia de los serovares I y III de Xanthomonas albilineans en plantas procedentes de áreas comerciales y vitroplantas de caña de azúcar*. Tesis para optar el grado de Máster en Microbiología General. La Habana: Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 2002.
- Montoliu, Almudena. *Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico: Aspectos comunes y específicos*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ingeniería Agrónoma. Castellón de la Plana, España: Universitat Jaume, 2010.
- Peralta, E. L., Martínez, B.; Martín, D. & Jones, P. Quality control for the production of pathogen-free plantlets in Cuban sugarcane biofactories. ISSCT Pathology and Molecular Biology Workshop, Abstracts. South Africa, 1997.
- Quistián, Deyanira & Valadez, J. A. Estrategias de defensa vegetal. *Planta*. 6 (12):10-13, 2011.
- Ryan, R. P.; Vorhölter, F. J.; Potnis, N.; Jones, J. B.; Van Sluys, M. A.; Bogdanove, A. J. *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (5):344-355, 2011.
- Saathoff, A. J.; Donze, Teresa; Palmer, N. A.; Bradshaw, J.; Heng-Moss, Tiffany; Twigg, P. *et al.* Towards uncovering the roles of swithgrass peroxidases in plant processes. *Front. Plant Sci.* 4:1-12, 2013.
- Santiago, R.; Armas, R. de; Legaz, M. E. & Vicente, C. Changes in phenolic acids content, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in sugarcane leaves induced by elicitors isolated from *Xanthomonas albilineans*. *Australas. Plant Path.* 38 (4):357-365, 2009.
- Sharma, P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S. & Pessaraki, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 10.1155/2012/217037, 2012.
- Sofa, A.; Scopa, A.; Nuzzaci, Maria & Vitti, Antonella. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (6):13561-13578, 2015.
- Van Loon, L. C.; Rep, M. & Pieterse, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162, 2006.