

EFFECTO DEL BION Y DEL FITOMAS COMO INDUCTORES DE RESISTENCIA EN PLANTAS DE ARROZ INFESTADAS CON *Steneotarsonemus spinki*

Belkis Peteira*, Arais Fernández*, H. Rodríguez** y E. González*

*Grupo de Fitopatología, **Grupo de Plagas Agrícolas, División de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: bpeteira@censa.edu.cu

RESUMEN: El empleo de inductores de resistencia en plantas se presenta como una alternativa amigable con el ambiente y atractiva para los productores. En el presente trabajo se estudió el efecto del Fitomas en la inducción de diferentes sistemas enzimáticos relacionados con los mecanismos de defensa en plantas de arroz infestadas con *Steneotarsonemus spinki* y se comparó con el efecto provocado por el BION en idénticas condiciones. Los resultados indican que la aplicación del Fitomas fue tan efectiva en la disminución de las poblaciones del ácaro como la aplicación del BION y que provocó la activación de enzimas como las peroxidasas, polifenoloxidasas, fenilalanil amonio liasas y quitinasas.

(Palabras clave: BION; Fitomas; resistencia inducida; resistencia sistémica adquirida; arroz; *Steneotarsonemus spinki*)

BION AND FITOMAS EFFECT AS RESISTANCE INDUCERS IN RICE PLANTS INFESTED WITH *Steneotarsonemus spinki*

ABSTRACT: The use of resistance inducers in plants appears as an ecologically amicable and attractive alternative for producers. In this work, the effect of Fitomas on the induction of different enzymatic systems associated with the defense mechanisms in rice plants inoculated with *Steneotarsonemus spinki* was studied and compared with that caused by BION under identical conditions. Fitomas was shown to be as effective in decreasing the mite population as when BION was applied. It caused the activation of enzymes such as peroxidases, polyphenol oxidases, phenylalanine ammonia liases and chitinases.

(Key words: BION; Fitomas; induced resistance; systemic acquired resistance; rice; *Steneotarsonemus spinki*)

INTRODUCCIÓN

Steneotarsonemus spinki Smiley (Acari: Tarsonedidae) es un ácaro de reciente introducción en el país y está considerado como el ácaro plaga más dañino al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) (2, 7). Por sus características etológicas, los productos químicos utilizados para su control son poco efectivos (15, 23). Por esta razón se hace necesaria la búsqueda de otras alternativas entre las que se encuentra la obtención de variedades tolerantes o resistentes (1, 5, 12).

Las plantas desarrollan frente a los organismos patógenos mecanismos de defensas muy complejos

y variados. Estos mecanismos pueden ser constitutivos o inducibles. Los inducibles se pueden activar sistémicamente en células y tejidos alejados, adquiriendo la planta una inmunidad fisiológica. En este sentido, el resultado es la inducción de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (de las siglas en inglés Systemic Acquired Resistance) y con ello, de un conjunto de proteínas y compuestos de defensa que incluyen enzimas involucradas en la vía de síntesis de los fenilpropanoides (Fenilalanina amonio liasa (PAL); Chalcona sintasa (CHS), Peroxidasas (PO), entre otras), glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HyP), relacionadas con el reforzamiento de la pared celular, y

Glucanasas y Quitinasas que hidrolizan las paredes celulares de los hongos, entre otras (20).

En la actualidad existen variados agentes químicos capaces de inducir estos mecanismos de defensa, pero que no muestran actividad antimicrobiana *in vitro*. Uno de estos compuestos es conocido como BION (Benzothiadiazol) (18). Se ha descrito que este tipo de compuestos "elicitors" actuarían como análogos estructurales y funcionales del ácido salicílico (SA) (17).

La idea de acelerar la respuesta de la planta mediante la aplicación de inductores de resistencia sistémica resulta atractiva y se presenta como una alternativa biológica, ambiental y comercialmente viable frente a la creciente necesidad de disminuir el uso de plaguicidas químicos en el control de agentes causantes de plagas (21). Por lo tanto, la demanda social de elicitors de respuestas de defensa de las plantas y compatibles con el medio ambiente, es cada vez mayor. Otro aspecto que puede favorecer el uso de estos compuestos es su procedencia, a partir de subproductos de un proceso o industria, lo cual abarata su obtención.

Fitomas es un bionutriente derivado de la industria azucarera producido por el Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Se presenta como un formulado acuoso y se le atribuyen propiedades estimuladoras de distintos procesos fisiológicos en las plantas y acción antiestrés. Estas cualidades hacen de la aplicación del Fitomas una alternativa atractiva para el control de plagas de forma más amigable con el ambiente, así como para el incremento de la producción y el rendimiento de los cultivos (16). Sin embargo, nada se conoce acerca de los mecanismos bioquímicos que elicitó este producto en las plantas.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación del Fitomas, tomando como referencia el BION como agente inductor de SAR, en plantas de arroz infestadas con el ácaro *Steneotarsonemus spinki*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Como material vegetal se utilizaron plantas de arroz (*Oryza sativa* L. var. Perla de Cuba), susceptible al ataque del ácaro *S. spinki*, las cuales se sembraron en cajuelas de zinc de 50 x 60 x 18 cm (largo, ancho y altura), que contenían suelo ferralítico rojo esterilizado. Se mantuvieron en condi-

ciones semicontroladas de casa de cristal, a una temperatura de aproximadamente 23°C, humedad relativa entre 80-85% y fotoperíodo natural.

A los 20 días de germinadas las semillas, las plantas fueron asperjadas con una solución de Fitomas de 1 mL/L (11) y de BION (1g/L, según instrucciones del fabricante), cada producto por separado y una mezcla de los dos. Se tomaron muestras foliares de cinco plantas para los diferentes análisis al primer, tercer y décimo día después de la aplicación de los inductores. Al décimo día se infestaron las plantas con el ácaro, para lo cual se distribuyeron homogéneamente sobre las plantas, secciones de vainas de arroz, de la variedad Perla de Cuba, de 2cm de longitud, infestadas con 10 ácaros. Se repite el procesamiento previamente descrito para la toma de muestras, a los 10 y 20 días después de la infestación con el ácaro. En el muestreo final se realizó el conteo de la población de la plaga en cinco plantas para cada tratamiento. Durante todo el experimento de dinámica se mantuvo un grupo de plantas como Control (sin infestar con el ácaro) y otro grupo de plantas que solamente fueron infestadas con el ácaro. A ambos grupos se le realizaron idénticos análisis en cada uno de los tiempos seleccionados.

Todas las muestras foliares fueron procesadas para la extracción de las enzimas. Esta se realizó por homogeneización de 2 g de material vegetal, con tres réplicas, en solución amortiguadora de extracción (Acetato de sodio 0.1 M pH 5.2), en proporción 2:1 (mL: gramo de peso fresco). El homogenato se agitó en zaranda durante 45 min en baño de hielo. Posteriormente se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 12000 g a 4°C, durante 25 minutos, en centrifuga refrigerada. Se utilizó el sobrenadante para realizar las determinaciones de la concentración de proteínas totales por el método descrito por Bradford (6), realizando las lecturas de la absorbancia a 595 nm del complejo proteína-Azul de Coomassie G-250 en un espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB), a partir de una solución patrón de 1mg/mL de albúmina bovina (BSA) para la curva patrón.

Las actividades enzimáticas de Peroxidasa (PO), Polifenol oxidasa (PPO), Fenilalanina amonio liasa (PAL) y Quitinasas se determinaron según los protocolos descritos por Fernández *et al.* (12) y Solórzano *et al.* (26). La actividad específica de cada uno de los métodos se calculó según la expresión:

$$\text{Act. Específica} = \text{UAct. Enzimática} / \text{conc de proteína (mg/mL)} = \text{UA.Enz/mg prot.}$$

Para determinar la influencia de los inductores sobre los niveles poblacionales de *S. spinki* se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) y las medias se compararon por la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, con un nivel de significación de $p < 0.05$ según paquete estadístico SAS (24). De igual forma se procedió con los valores obtenidos para las actividades enzimáticas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación del BION y del Fitomas provocó un aumento de los contenidos de PO a partir del tercer día del tratamiento, produciéndose un incremento más marcado a los 10 días, con un continuo ascenso, aunque menos pronunciado hasta el final de la dinámica de inducción. Los incrementos registrados para el control infestado con el ácaro fueron menores a los detectados para los tratamientos que recibieron inductores. Los mayores niveles se encontraron en presencia de la mezcla del BION y el Fitomas (Fig. 1).

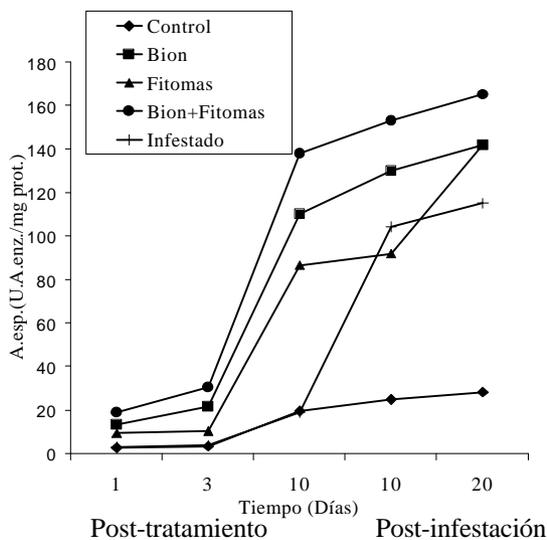


FIGURA 1. Efecto del Fitomas y el BION en los niveles de actividad específica de peroxidasa./ *Effect of Fitomas and BION on the specific activity levels of peroxidase. DS: 7.5.*

Esta misma tendencia se observa para las enzimas PPO, PAL y Quitinasas (Fig. 2-4). En todos los casos, el BION fue mejor inductor que el Fitomas y la mezcla de ambos produjo el mejor efecto, con la excepción de un efecto mayor del BION solo por encima de la mezcla de inductores para el caso de la enzima PAL, a partir de la inoculación con el ácaro.

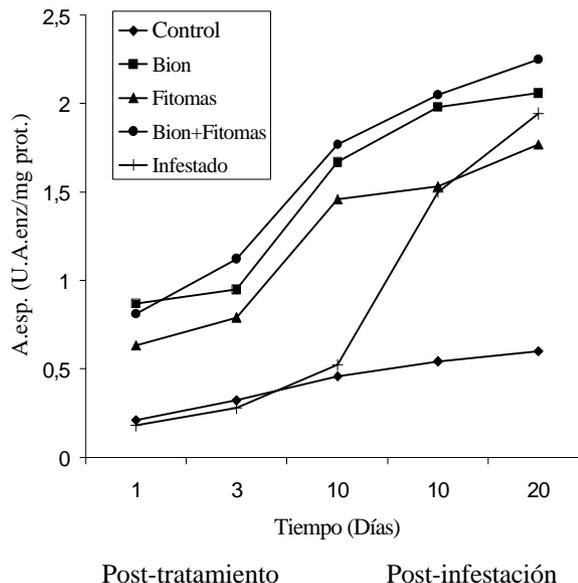


FIGURA 2. Efecto del Fitomas y el BION en los niveles de actividad específica de polifenol oxidasas./ *Effect of Fitomas and BION on the specific activity levels of polyphenol oxidases. DS: 0.09.*

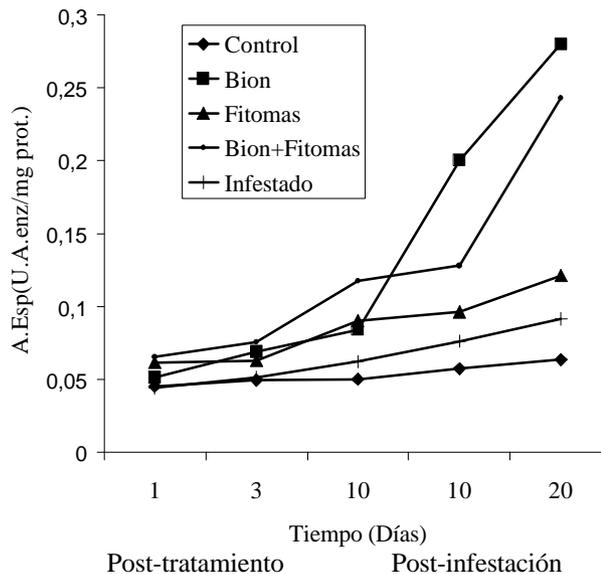


FIGURA 3. Efecto del Fitomas y el BION en los niveles de actividad específica de fenilalanina amonio liasa./ *Effect of Fitomas and BION on the specific activity levels of phenylalanine ammonia liases. DS: 0.03.*

Los resultados obtenidos para estas enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa coinciden con los bajos niveles de poblaciones del ácaro alcanzados en todas las variantes en las que se em-

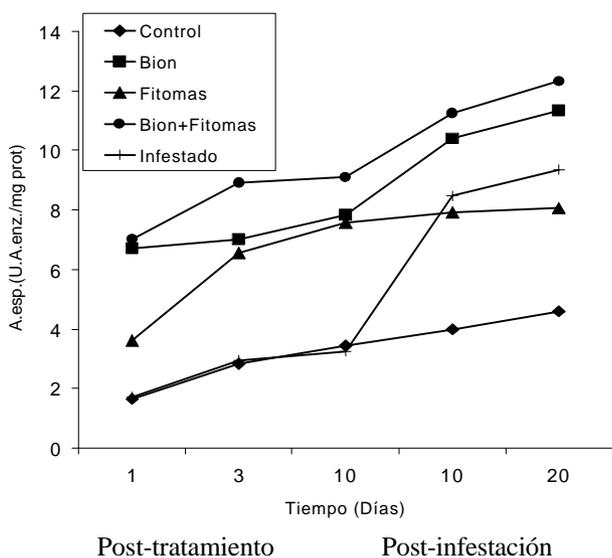


FIGURA 4. Efecto del Fitomas y el BION en los niveles de actividad específica de quitinasas. / *Effect of Fitomas and BION on the specific activity levels of chitinases.* DS: 0.15.

plearon inductores, tanto solos como mezclados, encontrándose para todos los casos valores estadísticamente similares y todos ellos estadísticamente diferentes del valor alcanzado por el control inoculado solamente con el ácaro y sin tratamiento inductor (Fig. 5).

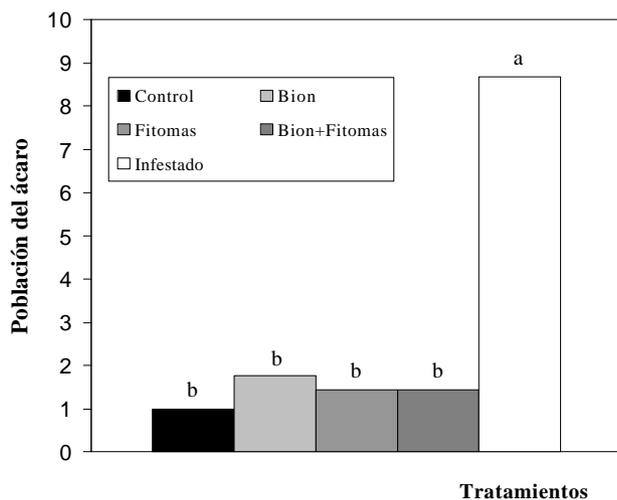


FIGURA 5. Efecto del Fitomas y el BION en las poblaciones del ácaro *S. spinki*. / *Effect of Fitomas and BION on the populations of the mite S. spinki.*

Barras seguidas de letras iguales difieren significativamente ($p < 0,05$).

El efecto beneficioso de algunos inductores de los mecanismos de defensa es un tema tratado en la literatura (19, 22, 28). El uso de químicos como inductores de resistencia es una extensa área de trabajo dirigida al desarrollo de nuevos compuestos para el control de plagas, reúne los requerimientos de seguridad en la aplicación en condiciones de invernaderos y campo, dado principalmente por la no toxicidad a patógenos, plantas o animales; no tener efectos negativos en el crecimiento vegetal, su desarrollo y rendimiento; emplearse en bajas concentraciones; provocar la inducción de un amplio espectro de defensas, efecto de protección duradera y bajo costo económico (14).

Estas características los diferencian de los plaguicidas; por lo tanto, la aplicación de inductores de resistencia es una nueva perspectiva para suplir a los químicos clásicos empleados en el control de plagas al proveer una protección efectiva a las plantas. Aún cuando se conoce que algunos inductores tienen mecanismos de acción diferentes a los que se presentan en los plaguicidas en general (14), es necesario conocer el efecto específico que provocan, así como su duración.

El único inductor de resistencia comercializado es el BTH. Fue descubierto en 1989 en la compañía Ciba-Geigy (Novartis), descrito por Ryals y sus colaboradores y se le conoce con el nombre de BION^{TMV} (en Europa) y Actigard^{TMV} (en Estados Unidos). El BION ha sido registrado y clasificado como compuesto de riesgo reducido en Estados Unidos en 1998 (28). Es el primer químico sintético no tóxico desarrollado y comercializado que funciona exclusivamente activando los genes SAR y se supone que actúa como un análogo funcional del ácido salicílico (8).

El BION se ha empleado de forma exitosa en diferentes especies vegetales tales como: papa (4), algodón (9), guisante (10), trigo (13), girasol (25), tomate (27), tabaco (28), entre otros. En nuestro país se empleó para estudios similares en el cultivo del tomate por Solórzano (comunicación personal)¹, para la inducción de resistencia frente a *Alternaria solani*.

El Fitomas, por su parte, ha sido probado en cultivos como caña de azúcar, tomate, pepino, tabaco, yuca, acelga, boniato, lechuga, habichuela, frutabomba, con vistas a mejorar las respuestas antiestrés en casos de sequía, exceso de humedad, fitotoxicidad, desequilibrios nutricionales, salinidad, plagas y enfermedades, daños mecánicos (vientos

¹ Dra. Ernestina Solórzano. Investigador Auxiliar. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA).

fuertes, podas, trasplantes, entre otros.) y como estimulante de procesos tales como nutrición, crecimiento, floración, fructificación, germinación y enraizamiento (16).

Se plantea, que este estimulador contiene las estructuras bioquímicas (aminoácidos, oligosacáridos, bases nitrogenadas) más demandadas por la mayor parte de las especies botánicas a las que pertenecen las plantas de cultivo (16), por lo tanto, pudiera pensarse que alguno de estos elementos pueden ejercer la función de elicitor, especialmente los oligosacáridos (3,11).

El Fitomas, además, es un compuesto de producción nacional, más fácil y menos costoso de adquirir. Por los resultados de este estudio pudiera incluirse como una alternativa más para el manejo de esta importante plaga, donde el control químico es prácticamente inefectivo. Este es el primer informe sobre su efecto en la inducción de resistencia frente a ácaro y en el cultivo del arroz.

Por otra parte, el efecto positivo sobre un amplio espectro de defensas por parte de los inductores en general, es una característica que resulta particularmente importante. Como se observa en los resultados obtenidos, a partir de la aplicación del BION, no solo se indujeron enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa en la interacción estudiada en este caso, sino también se induce la producción de otras enzimas, por ejemplo, las quitinasas. Hay informes que detectan para este inductor, también incrementos en la síntesis de glucanasas (9). Ambas enzimas están más directamente relacionadas a los mecanismos de defensa frente a enfermedades de origen fungoso y bacteriano. Por lo tanto, el BION puede ser empleado para incrementar la resistencia a estas enfermedades y el Fitomas también, ya que responde a estas características por tener un efecto directo sobre la inducción de quitinasas, como ha quedado demostrado en este trabajo.

Podemos concluir por lo tanto que el Fitomas y el BION disminuyeron de manera efectiva la población de *S. spinki* en condiciones de casa de cristal, actuando como activadores de la respuesta de defensa del arroz, al incrementar los niveles de actividades de PO, PPO, PAL y quitinasas en las plantas tratadas, en comparación con las plantas sin tratar. Se recomienda ampliar esta experiencia a pequeñas parcelas experimentales para comprobar su acción en condiciones de campo, con vistas a su inclusión en la estrategia de manejo de esta plaga, así como probar el efecto del Fitomas en la protección contra otras enfermedades en las cuales las enzimas estudiadas pueden ser efectivas como mecanismos de defensa.

REFERENCIAS

1. Almaguel, Lérica; Hernández, J.; Cabrera, R.I. y Botta, E. (2005): Propuesta de Manejo del ácaro del vaneado del arroz para los países de la región de Latinoamérica y el Caribe. En: *III Encuentro Internacional del Arroz*. Palacio de las Convenciones. Ciudad de La Habana, 6-10 de junio, pag. 53-59.
2. Almaguel, Lérica; Santo, A.; de la Torre, P.; Botta, E.; Hernández, J.; Cáceres, Idalia y Ginarte, A. (2003): Dinámica poblacional e indicadores ecológicos de *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) en arroz de riego en Cuba. *Fitosanidad*. 7(1): 23-30.
3. Aziz, A.; Poinssot, B.; Daire, X.; Adrian, M.; Beier, A.; Lambert, B.; Joubert, J.M. y Pugin, A. (2003): Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe Inter*. 16: 1118-1128.
4. Bokshi, A.I.; Morris, S.C. y Deverall, B.J. (2003): Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathol*. 52: 22-27.
5. Botta, E.; Almaguel, Lérica.; González, J.; Arteaga, Ibis y Hernández, J. (2003): Evaluación del comportamiento de *Steneotarsonemus spinki* Smiley (Acari: Tarsonemidae) en diferentes variedades de arroz durante los años 2000-2001. *Fitosanidad*. 7(2): 25-29.
6. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 73: 248-250.
7. Cabrera, R.I.; Nugaliyadde, L. y Ramos, Mayra (2002): Presencia de *Hirsutella nodulosa* sobre el ácaro tarsonémido del arroz *Steneotarsonemus spinki* (Acari: Tarsonemidae) en Sri Lanka. En: *Encuentro Internacional del Arroz*, La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones del Arroz. pág. 186-188.
8. Cohen, Y. (2001): The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica*. 29: 375-378.
9. Colson-Hanks, E.S.; Allen, S.J. y Deverall, B.J. (2000): Effect of 2,6-dichloroisonicotinic acid or benzothiadiazole on *Alternaria* leaf spot, bacterial blight and *Verticillium* wilt in cotton under field conditions. *Australian Plant Pathol*. 29: 170-177.

10. Dann, E.K. y Deverall, B.J. (2000): Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathol.* 49: 324-332.
11. Edreva, Aglika (2004): A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *J. Cell and Mol. Biol.* 3: 61-69.
12. Fernández, Arais; Solórzano, Ernestina y Miranda, Ileana (2005): Actividad peroxidasa, glucanasa, polifenol oxidasa y fenilalanina amonio liasa en variedades de arroz con diferente grado de susceptibilidad al ácaro *Steneotarsonemus spinki*. *Rev. Protección Veg.* 20(2): 132-136.
13. Görlach, J.; Volrath, S.; Knauf Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K.H.; Oostendorp, M.; Staub, T.; Ward, E.; Kessman, H. y Ryals, J. (1996): Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell.* 8: 629-643.
14. Kuc, J. (2001): Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur J. Plant Pathol.* 107: 7-12.
15. Miranda, Ileana; Ramos, Mayra y Fernández, Miriam B. (2003): Factores que influyen en la abundancia de *Steneotarsonemus spinki* en arroz, en Cuba. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología.* 69: 34-37.
16. Montano, R.; Villar, J.; García, A.; García, T.; García, R.; González, M.; Fernández, I.; Martínez, O.; Pérez, O.; Gallego, E. y Viñals, M. (2005): FitoMas E. Bionutriente Derivado de la Industria Azucarera. En: *1er Taller de Producciones Agrícolas*, La Habana, Cuba.
17. Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B. y Staub, T. (2001): Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 19-28.
18. Raddatz, E. (2001): Vam, y la resistencia de las plantas contra causantes de daños. (En línea). Disponible en http://eidenar.univalle.edu.co/tecnologia1/VAMMYCORAL_y_la_Resistencia_1.doc. (Consultado: 18-10-06).
19. Radman, R.; Saez, T.; Bucke, C. y Keshavarz, T. (2003): Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotech and Appl. Biochem.* 37: 91-102.
20. Reymond, P. y Farmer, E. (1998): Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Cur. Opin. Plant Biol.* 1: 404-411.
21. Riveros, A.S.; Rosales, F.E. y Pocasangre, L.E. (2004): Manejo alternativo de *Mycosphaerella fijiensis* a través de la inducción de resistencia y uso de bioproductos. En: *XVI Reunión Internacional ACORBAT 2004*. (En línea). Disponible en http://www.inibap.org/pdf/IN050666_es.pdf. (Consultado: 18-10-06).
22. Sakamoto, K.; Tada, Y.; Yokozeki, Y.; Akari, H.; Hayashi, N.; Fujimura, T. y Ichikawa, N. (1999): Chemical induction of disease resistance in rice correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site an leucine-rich repeats. *Plant Mol. Biol.* 40: 847-855.
23. Santos, Renata, Navia, Dennise y Cabrera, R.I. (2004): *Steneotarsonemus spinki* (Acari: Prostigmata: Tarsonemidae) – uma ameaca para a cultura do arroz no Brasil. *Documento 117/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasilia.*
24. SAS (2001): Institute Statistical Analysis software SAS. Version 8.02. Cary, NC, USA.
25. Sauerborn, J.; Buschmann, H.; Ghiasvand Ghiasi, K. y Kogel, K.H. (2002): Benzothiadiazole activates resistance in sunflower (*Helianthus annuus*) to the root-parasitic weed *Orobanche cumana*. *Phytopathology.* 92: 59-64.
26. Solórzano, Ernestina; Meneses, A.R.; Yakelin, Rodríguez; Pérez, E.; Arais, Fernández; Belkis, Peteira y Ondina, León. (2001): Inducción de cinco sistemas enzimáticos en la simbiosis tomate – micorriza arbuscular (MA). *Rev. Protección Veg.* 16(1): 30-39.
27. Soyly, S.; Baysal, O. y Soyly, E.M. (2003): Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S methyl (ASM) against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Sci.* 165: 1069-1076.
28. Tally, A.; Oostendorp, M.; Lawton, K.; Staub, T. y Bassy, B. (1999). Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. En: *Inducible Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. Agrawal, A. A.; Tuzun, S. y Bent, E. (Ed). *Amer. Phytopathol. Soc. Press*, St. Paul, MN (USA). 357-369.

(Recibido 1-12-2006; Aceptado 1-3-2007)