

# APLICACIONES DE BABA Y BTH EN BRINZALES DE *PINUS PINASTER* PARA LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA ANTE *FUSARIUM CIRCINATUM*

María Vivas Conejero y Alejandro Solla Hach

Ingeniería Forestal y del Medio Natural. Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2. 10600-PLASENCIA (Cáceres, España). Correo electrónico: asolla@unex.es

## Resumen

*Fusarium circinatum* es un hongo patógeno causante del chancro resinoso del pino que provoca mortalidad en viveros y en plantaciones adultas. Se establece la hipótesis de que los inductores de resistencia en plantas, el ácido DL- $\beta$ -aminobutírico (BABA) y el benzotiadiazol (BTH), puedan actuar como elicitadores de los mecanismos defensivos de *Pinus pinaster* ante este patógeno. El experimento se llevó a cabo con semillas de 39 clones de *P. pinaster* mejorados y de una progenie no mejorada (control). A los 7 meses de la siembra, las plántulas fueron tratadas con (i) BABA a 25mM, (ii) BTH a 1 mM y (iii) agua destilada estéril ( $n = 60$ ). Un día después de los tratamientos, las plantas fueron inoculadas con *F. circinatum*. En general, los tratamientos con BABA o BTH incrementaron la mortalidad causada por *F. circinatum* ( $P < 0,001$ ). Sin embargo, este resultado varió significativamente según la familia ( $P < 0,001$ ). Algunas familias mostraron resistencia inducida con ambos compuestos, otras sólo con BABA y otra sólo con BTH, aunque la mayoría no lo hicieron con ninguno de los dos compuestos. A pesar de los resultados negativos obtenidos a nivel general, de poca utilidad en viveros, interesa seguir estudiando los cuatro grupos de respuesta contrastada, a fin de identificar en planta compuestos químicos desencadenantes de la inducción de resistencia.

Palabras clave: Pino marítimo, Chancro resinoso, Variación familiar, ácido DL-3-amino-n-butanóico (DL-, -aminobutírico) y el compuesto Benzo [1,2,3]thiadiazol-7-carbotiónico ácido-S-methyl

## INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen estrategias de defensa constitutivas e inducidas para resistir el ataque de insectos y patógenos. Las defensas constitutivas se encuentran de forma permanente en el árbol y representan las primeras barreras de protección de la planta. Las defensas inducidas son activadas por la planta una vez se ha producido el ataque del insecto o patógeno, la finalidad de estas defensas es responder de forma eficaz a futuros peligros (FRANCESCHI et al. 2005). La activación de las defensas inducidas durante eta-

pas tempranas a la interacción planta-patógeno podría disminuir o eliminar los daños causados en la planta debido al ataque de organismos nocivos. Se han descrito sustancias químicas y biológicas capaces de aumentar ciertos compuestos defensivos en plantas. Estas sustancias, conocidas como inductores, son capaces de desencadenar los mecanismos de defensa de las plantas sin mostrar un efecto antibiótico directo. El ácido DL-3-amino-n-butanóico (DL- $\beta$ -aminobutírico) (BABA) y el compuesto Benzo [1,2,3]thiadiazol-7-carbotiónico ácido-S-metil éster (Bion®) (BTH) son dos conocidos induc-

tores químicos de resistencia en plantas, que actúan contra un amplio espectro de patógenos (COHEN, 2002; BARILLI *et al.*, 2010).

*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (teleomorfo *Gibberella circinata*) es un hongo causante del chancro resinoso del pino. Originario del sureste de Estados Unidos, su primera detección en la UE tuvo lugar en un vivero del País Vasco, sobre *Pinus radiata* y *P. pinaster* (LANDE-RAS *et al.*, 2005). Recientemente, *F. circinatum* también se ha detectado en *P. halepensis* y *P. pinea* en Italia (CARLUCCI *et al.*, 2007) y en brinzales de *P. radiata* y de *P. pinaster* en Portugal (BRAGANÇA *et al.*, 2009). Los síntomas que causa el patógeno incluyen marchitamientos de plántulas en pre- y postemergencia, clorosis o enrojecimiento de acículas, torsión y puntiseado de brotes, aparición de chancros resinosos, aborto de piñas y mortalidad del árbol (CAREY & KELLEY, 1994).

El pino marítimo (*P. pinaster* Ait.) es una conífera natural de la cuenca mediterránea occidental. En España es la especie más utilizada en plantaciones, con una gran importancia en la economía forestal. La detección de *F. circinatum* en el norte de la Península Ibérica representa un problema fitosanitario, pues se trata de un patógeno de cuarentena, y una amenaza para las plantaciones de *P. radiata* y posiblemente también para *P. pinaster*. Actualmente no existe ningún medio para controlar la enfermedad. A pesar de ello, para paliar los daños se sugiere un adecuado manejo selvícola de las plantaciones, prácticas de higiene en viveros, la implantación de medidas de cuarentena y la selección de genotipos menos susceptibles (WINGFIELD *et al.*, 2008).

En este trabajo se parte de la hipótesis de que los compuestos BABA y el BTH puedan actuar como inductores de los mecanismos defensivos de *P. pinaster* ante *F. circinatum*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

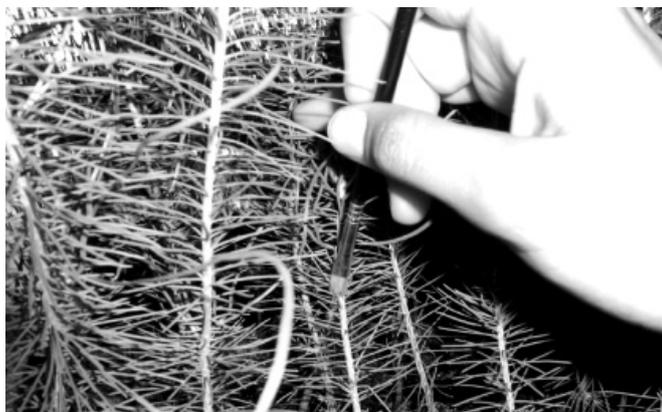
El experimento se llevó a cabo con semillas de 39 clones de *P. pinaster* mejorados (Huerto semillero de Sergude, Xunta de Galicia, Consellería de Medio Rural, 42° 49' N, 8° 27' O) y de una progenie de polinización abierta no mejorada (Cangas de Morrazo, Pontevedra 42° 16' N, 8° 47' O) que sirvió de control. El ensayo

se realizó en un invernadero cerrado de metacrilato ubicado en el Centro Universitario de Plasencia (Cáceres). La siembra se hizo en diciembre de 2008, utilizándose alveolos de 250 ml agrupados en bandejas de 40 alveolos, y una semilla por alveolo. Como sustrato se utilizó arena estéril y turba (3:1). Se siguió un diseño completo de bloques al azar con 60 bandejas repartidas en 2 bloques, de modo que cada bandeja incluía una semilla de cada una de las 40 familias. Se utilizaron un total de 2.400 semillas.

A los 7 meses de la germinación, las plántulas fueron tratadas con BABA y BTH e inoculadas con *F. circinatum*. Para decidir las dosis de BABA y BTH a utilizar, y el intervalo de tiempo entre los tratamientos y la inoculación, se realizó un ensayo previo con menor número de plantas (n = 10). Se testaron aplicaciones de BABA a 10; 25 y 50 mM, y aplicaciones de BTH a 1; 5 y 10 mM, en intervalos de 1; 3; y 5 días de separación frente a la inoculación con *F. circinatum*. Las dosis de BABA y de BTH que mayor protección ofrecieron a las plantas ante *F. circinatum* fueron 25 y 1 mM, respectivamente, aplicadas un día antes de las inoculaciones. No se observaron síntomas de toxicidad.

Los tratamientos aplicados fueron (i) BABA a 25 mM, (ii) BTH a 1 mM, y (iii) agua destilada estéril. La aplicación se realizó pincelando el tallo de cada plántula con las distintas soluciones (Figura 1). Un día después de los tratamientos, todas las plantas fueron inoculadas con *F. circinatum*. La cepa de *F. circinatum* utilizada (F 7-1, MAT-1, aislada en 2005 en Asturias) fue suministrada por el Laboratorio de Patología de la EUIT Forestal de Madrid (UPM). El inóculo se preparó mediante el cultivo del patógeno en PDA a oscuridad y temperatura de laboratorio. *F. circinatum* normalmente no penetra en tejidos de pino intactos, y para la infección es necesaria la existencia de heridas (DWINELL & BARROWS-BROADBENT, 1981). Por ello la inoculación se realizó poniendo en contacto micelio de *F. circinatum* sobre incisiones longitudinales de 1 mm practicadas con bisturí a 10 cm del suelo (MUÑOZ Y AMPUDIA, 2005) (Figura 2).

Después de la inoculación se evaluó semanalmente la aparición de síntomas, y como referencia se utilizó la clasificación propuesta por CORRELL *et al.* (1991): (0) sano, sin necrosis;



**Figura 1.** Aplicación de tratamientos mediante el pincelado del tallo de una planta de *Pinus pinaster*



**Figura 2.** Inoculación con *Fusarium circinatum* poniendo en contacto micelio del hongo sobre incisiones longitudinales de 1 mm practicadas con bisturí a 10 cm del suelo, en el tallo verde de *Pinus pinaster* (MUÑOZ Y AMPUDIA, 2005)

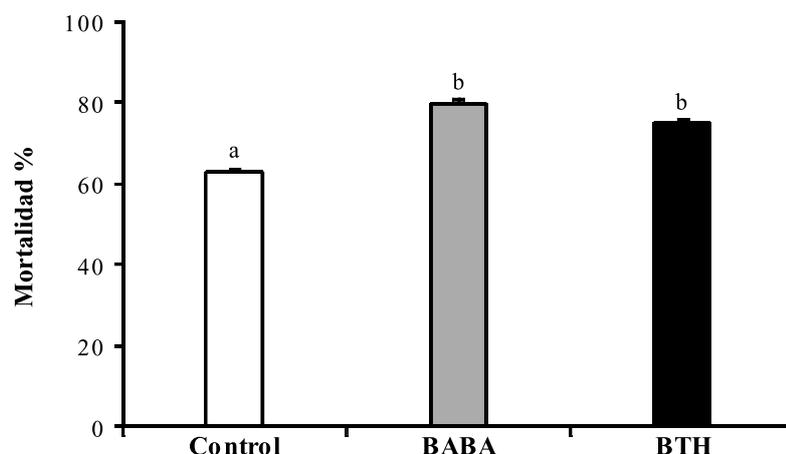
(1), acículas verdes y necrosis sólo en el punto de inoculación; (2) acículas verdes y necrosis superior a 2 cm en las proximidades del punto de inoculación; (3) acículas y/o brotes marchitos, y necrosis anillando el brote; y (4) brote anillado y follaje muerto desde el extremo distal al punto de inoculación. Debido al reducido tamaño de los tallos no se pudo cuantificar la necrosis de las plántulas. A las 8 semanas de la inoculación se realizó una evaluación final de los daños y posteriormente se constataron los postulados de Kock reaislando el patógeno *F. circinatum* en medio selectivo K (KOMADA, 1975). Al final del experimento todo el material utilizado (sustrato incluido) fue esterilizado y el interior del invernadero reiteradamente pulverizado con Captan (RAMÓN-ALBALAT *et al.*, 2010).

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Statistica v7.0 (Stat Software Inc.,

Tulsa, OK, USA). Para comparar la incidencia (porcentaje de plantas afectadas), la intensidad de los daños (grado medio de daño de las plantas afectadas) y la mortalidad de las plántulas (variables dependientes) entre los tratamientos y las familias (factores), se utilizó un modelo GLZ (Generalized Logit Model).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas tratadas con BABA o BTH mostraron mayores síntomas y mayor mortalidad causada por *F. circinatum* que las plantas tratadas con agua (Figura 3;  $P < 0,001$ ). Los resultados, sin embargo, variaron según la familia utilizada ( $P < 0,001$ ). Las familias 2031, 2054 y 2082 mostraron menor mortalidad ante tratamientos de BABA o de BTH que ante el trata-

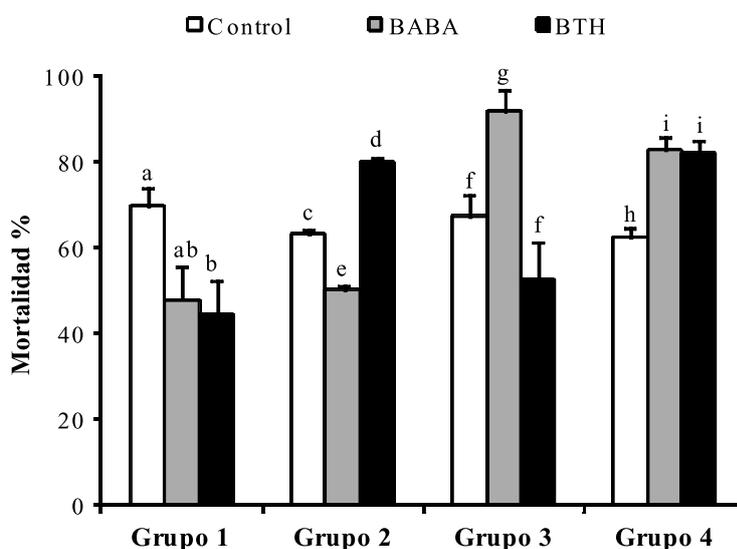


**Figura 3.** Mortalidad (%) causada por *Fusarium circinatum* en plántulas de *Pinus pinaster* tratadas con agua (control), BABA y BTH. Las barras son errores estándar, y letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

miento control de agua (grupo 1), la familia 1003 mostró menor mortalidad ante tratamientos de BABA que ante el tratamiento de agua (grupo 2), y las familias 1059, 2041, 2050, 2053, y 2077 mostraron menor mortalidad ante BTH que ante agua (grupo 3, Figura 4). El resto de las familias, incluida la control, presentó una mayor mortalidad ante *F. circinatum* si sus plantas fueron tratadas tanto con BABA como con BTH (grupo 4, Figura 4). Los resultados sugieren claramente que la activación de defensas inducidas en *P. pinaster* ante *F. circinatum* depende de la progenie seleccionada. Estudios recientes, realizados con el mismo material vegetal, muestran

una significativa variación interfamiliar en cuanto al peso medio de la semilla, el momento de germinación, el crecimiento y la respuesta ante *F. circinatum* (VIVAS *et al.*, 2012a).

Además de la influencia genética, hay que tener en cuenta que el efecto de los inductores de resistencia puede variar en función de la concentración utilizada, el momento de aplicación y el patosistema considerado (BONELLO *et al.*, 2006). El ensayo previo realizado para calcular las dosis y el momento de aplicación de los tratamientos se realizó a los 5 meses de la germinación de las plántulas. Esta diferencia pudo haber provocado que las dosis de BABA y BTH utili-



**Figura 4.** Mortalidad (%) causada por *Fusarium circinatum* en grupos de familias de *Pinus pinaster* tratados con agua (control), BABA y BTH. Las barras son errores estándar, y letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

zadas ante plántulas de 7 meses no hayan sido las adecuadas o suficientes para activar defensas. Además, los cambios desencadenados por los inductores de resistencia en las plantas tienen lugar en horas o a los pocos días tras los tratamientos (VAN LOO *et al.*, 2006), por lo que no se descarta que el plazo utilizado entre tratamiento e inoculación fuera incorrecto para evitar los daños del patógeno.

Es de destacar la gran virulencia del hongo utilizado. Estudios realizados con metil jasmonato, otro inductor de resistencia, no consiguieron reducir la mortalidad en plántulas de *P. pinaster* ante *F. circinatum* (VIVAS *et al.*, 2012b). Probablemente la dispersión del patógeno en el interior de los tejidos fue más rápida que la formación de respuestas defensivas efectivas, siendo rápidamente superado el umbral de resistencia de las plántulas por el patógeno.

Se ha observado que la resistencia inducida ante *F. circinatum* tiene lugar en *P. radiata* si se utiliza como inductor el propio patógeno (GORDON *et al.*, 2010), pero este hecho nunca ha sido demostrado en *P. pinaster*. Las coníferas representan un grupo de especies apropiado para avanzar en el conocimiento de los inductores de defensa (BONELLO *et al.*, 2006; GORDON *et al.*, 2010). A pesar de ello, la mayoría de los estudios basados en el BABA y el BTH se concentran en el campo de la agricultura. El único informe existente sobre los efectos del BTH en la resistencia a patógenos en coníferas concluyó que la pulverización foliar con BTH redujo significativamente las infecciones por *Phytophthora cinnamomi* en *P. radiata* (ALI *et al.*, 2000). A pesar de nuestros resultados, poco convincentes a nivel práctico, se debe seguir estudiando la influencia de la variación familiar ante la distinta respuesta inductora ocasionada por los tratamientos de BABA y de BTH. Un análisis químico e histoquímico de los cuatro grupos de respuesta (Figura 4) tal vez permita dilucidar e identificar cuales son los compuestos desencadenantes de la inducción de resistencia.

### Agradecimientos

Agradecemos a Rafael Zas (MBG-CSIC), Luis Sampedro (CIF Lourizán) y Carmen Muñoz

(EUIT Forestal) por habernos proporcionado las semillas, el BTH y la cepa de *Fusarium circinatum*, respectivamente. Este trabajo se ha realizado bajo la financiación del Proyecto INIA-RTA07-100-C2. María Vivas ha sido financiada por una beca FPU del Ministerio de Ciencia e Innovación (Resolución 2 de diciembre de 2008).

### BIBLIOGRAFÍA

- ALI, Z.; SMITH, I. & GUEST, D.; 2000. Combinations of potassium phosphonate and Bion (acibenzolar-S-methyl) reduce root infection and dieback of *Pinus radiata*, *Banksia integrifolia* and *Isopogon cuneatus* caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Australas. Plant Pathol.* 29: 59-63.
- BARILLI, E.; PRATS, E. & RUBIALES, D.; 2010. Benzothiadiazole and BABA improve resistance to *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in *Pisum sativum* L. with an enhancement of enzymatic activities and total phenolic content. *Eur. J. Plant Pathol.* 128: 483-493.
- BONELLO, P.; GORDON, T.R.; HERMS, D.A.; WOOD, D.L. & ERBILIGIN, N.; 2006. Nature and ecological implications of pathogen-induced systemic resistance in conifers: A novel hypothesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 68: 95-104.
- BRAGANÇA, H.; Diogo, E.; Moniz, F. & Amaro, P.; 2009. First report of pitch canker on pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Dis.* 93: 1079.
- CAREY, W.A. & KELLEY, W.D.; 1994. First report of *Fusarium subglutinans* as a cause of Late-Season mortality in Longleaf Pine nurseries. *Plant Dis.* 78: 7.
- CARLUCCI, A.; COLATRUGLIO, L. & FRISULLO, S.; 2007. First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Dis. notes* 91: 1683.
- COHEN, Y.R.; 2002.  $\beta$ -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Dis.* 86: 448-457.
- CORRELL, J.C.; GORDON, T.R.; MCCAIN, A.H.; FOX, J.W.; KOEHLER, C.S.; WOOD, D.L. & SCHULTZ, M.E.; 1991. Pitch canker disease in California: Pathogenicity, distribution,

- and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Dis.* 75: 676-682.
- DWINELL, L.D. & BARROWS-BROADDUS, J.; 1981. Pitch canker in seed orchards. *In: 16th Southern Forest Tree Improvement Conference: 234-240.*
- FRANCESCHI, V.R.; KROKENE, P.; CHRISTIANSEN, E. & KREKLING, T.; 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against beetles and other pests. *New Phytol.* 167: 353-376.
- GORDON, T.R.; KIRKPATRICK, S.C.; AEGERTER, B.J.; FISHER, A.J.; STORER, A.J. & WOOD, D.L.; 2010. Evidence for the occurrence of induced resistance to pitch canker, caused by *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*), in populations of *Pinus radiata*. *Forest Pathol.* 41: 227-232.
- KOMADA, H.; 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8: 114-125.
- LANDERAS, E.; GARCÍA, P.; FERNÁNDEZ, Y.; BRAÑA, M.; FERNÁNDEZ-ALONSO, O.; MÉNDEZ-LODOS, S.; PÉREZ-SIERRA, A.; LEÓN, M.; ABAD-CAMPOS, P.; BERBEGAL, R.; BELTRÁN, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. & ARMENGOL, J.; 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. *Plant Dis.* 89: 1015.
- MUÑOZ, C. Y AMPUDIA, M.; 2005. Ensayos de patogenicidad de *Fusarium circinatum* Nirenberg y O'Donnell en plantas de *Pinus radiata* D. Don. *En: S.E.C.F.-Gobierno de Zaragoza (eds.), 4º Congreso Forestal Español-La ciencia forestal: Respuestas para la sostenibilidad: 369 + CD Rom.* Gráficas Zaragoza. Zaragoza.
- RAMÓN-ALBALAT, A.; BERBEGAL, M.; PÉREZ-SIERRA, A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Y ARMENGOL, J.; 2010. Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Fusarium circinatum*. *En: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco (eds.), Actas del XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología PAN-203: 380.* Gráficas Varona. Euskadi.
- VAN LOON, L.C.; REP, M. & PIETERSE, C.M.J.; 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- VIVAS, M.; ZAS, R., & SOLLA, A.; 2012a. Screening of Maritime pine (*Pinus pinaster*) for resistance to *Fusarium circinatum*, the causal agent of Pitch Canker disease. *Forestry* 85: 185-192.
- VIVAS, M.; MARTÍN, J.M.; GIL, L. & SOLLA, A.; 2012b. Evaluating methyl jasmonate for induction of resistance to *Fusarium oxysporum*, *F. circinatum* and *Ophiostoma novoulmii*. *Forest Systems* 21: 289-299.
- WINGFIELD, M.J.; HAMMERBACHER, A.; GANLEY, R.J.; STEENKAMP, E.T.; GORDON, T.R.; WINGFIELD, B.D. & COUTINHO, T.A.; 2008. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australas. Plant Pathol.* 37: 319-334.