

# Sanidad vegetal e indicadores bioquímicos de resistencia sistémica a la gota en sistemas de agricultura ecológica y convencional

T. León,<sup>1</sup> C. Sánchez,<sup>2</sup> M. Fajardo, C. Ramírez,<sup>3</sup> D. Castellanos<sup>4</sup> y M. Guardiola.<sup>5</sup>

## COMPENDIO

Como un primer paso en el estudio del control de la gota en papa con sistemas de agricultura convencional (uso de fungicidas) y ecológica (uso de Caldos Microbianos de Rizosfera y extracto fermentado de Chipaca (*Bidens pilosa*)), se analizó la incidencia y severidad de la enfermedad y los contenidos de  $\beta$ -(1,3)-glucanasas y peroxidases como indicadores bioquímicos de resistencia sistémica inducida (ISR). Se encontró que la actividad de las  $\beta$ -(1,3)-glucanasas y de peroxidases de citoplasma y pared celular fueron significativamente mayores tanto en plantas sanas como enfermas del sistema ecológico frente al convencional. Se registró un posible "efecto represor" de los fungicidas empleados sobre los procesos de defensa enzimática de las plantas, expresados a través de la presencia significativamente menor de  $\beta$ -(1,3)-glucanasas y de peroxidases en plantas de papa con el sistema convencional. Sin embargo, el sistema de agricultura ecológica no resultó tan eficiente en el control de la gota como los fungicidas empleados en el sistema convencional.

**Palabras claves:** *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*, Caldos Microbianos de Rizosfera, incidencia, severidad, actividad peroxidásica, actividad glucanásica, *Bidens pilosa*.

## ABSTRACT

As a first step in the studies to control Blight Late in potato under conventional (use of fungicides) and organic farming systems (use of Microbial Rhizosphere Broths and fermented extract of Chipaca (*Bidens pilosa*)), incidence and disease severity and biochemical markers of induced systemic resistance (ISR) were studied. The activity of  $\beta$ -(1,3)-glucanases and peroxidases of cytoplasm and cellular wall were significantly bigger in healthy and diseased plants of the organic farming system. We registered a possible "repressing effect" of the fungicides employees on the processes of defense of the plants, expressed through the low accumulation of  $\beta$ -(1,3)-glucanases and of peroxidases. However, the organic farming system was not so efficient for the control of the Blight Late as the fungicides employees in the conventional system.

**Key words:** *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*, microbial Rhizosphere Broths, incidence, severity, peroxidase activity, glucanase activity, *Bidens pilosa*.

## INTRODUCCIÓN

La Resistencia Sistémica Inducida (ISR), un tipo de respuesta defensiva de las plantas ante el ataque de patógenos, se ha generado con cepas específicas de Bacterias Promotoras del Crecimiento (PGPR) en tabaco, pepino, fríjol, rábano, claveles, arabidopsis y tomate (Van Loon, 1998; Kloepper, 1993; Liu *et al.*, 1995; Leeman *et al.*, 1995; Pieterse *et al.*, 1996).

No obstante en el medio tropical colombiano todavía no se utilizan masivamente PGPR, pero en su lugar muchos productores están aplicando con mayor frecuencia técnicas de bajos insumos en las que se destaca la preparación de Caldos Microbianos de Rizosfera (CMR), de plantas sanas tomadas de los mismos lugares de cultivo, los cuales tienen la ventaja de contener los microorganismos nativos de acción benéfica y, adicionalmente, de actuar sobre el conjunto general de las propiedades físicas y químicas del suelo (Ramírez, 1996a).

En el artículo se consignan los resultados en la primera fase del estudio, que consistió en identificar indicadores bioquímicos de resistencia en plantas sanas y enfermas de papa, como primer paso para su aislamiento y utilización en caldos microbianos.

<sup>1</sup> Agrólogo. Ph.D. Instituto de Estudios Ambientales. Universidad Nacional de Colombia. teleonsi@bacata.usc.unal.edu.co

<sup>2</sup> Bacterióloga M.Sc. Centro Internacional de Física. Laboratorio de Biotecnología.

<sup>3</sup> Agrólogo Especialista en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Posgrado en Microbiología. jijimai@hotmail.com

<sup>4</sup> Microbióloga Universidad Javeriana. Centro Internacional de Física. Laboratorio de Biotecnología. biotcif@tutopia.com

<sup>5</sup> Bióloga. M.Sc. Centro Internacional de Física. Laboratorio de Biotecnología biotcif@tutopia.com

**MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en dos fincas adyacentes: Gabeno (ecológica) y San Carlos (convencional), ubicadas en la vereda Chitasugá, municipio de Tenjo, Cundinamarca (Colombia). La zona posee un clima seco y frío, con precipitaciones promedio anuales de 1.000 mm y temperaturas de 16°C. Los suelos, clasificados como *Typic melanudands*, son bien drenados, profundos, planos (pendientes menores del 1%), de texturas finas y estructura débil a moderada. Químicamente son suelos fuertemente ácidos (pH entre 5.2 y 5.3), bajos en fósforo (6 a 16 ppm), calcio (2.080 mg/kg) y magnesio (320 mg/kg), al igual que en algunos microelementos (manganeso, cobre, zinc y boro). Presenta contenidos altos de potasio (alrededor de 1.200 mg/kg) y de hierro (44 ppm). El carbono ecológico (entre 8 y 13%), el nitrógeno total y sus fracciones NH<sub>4</sub> y NE<sub>2</sub> (25 ppm), al igual que la capacidad catiónica de cambio (67 me/100 g) se encuentran en valores altos.

El experimento se diseñó completamente al azar (Tabla 1) con cuatro tratamientos y tres replicaciones. En cada finca se ubicaron seis parcelas de 30 m<sup>2</sup> (6x5 m), tres de las cuales se utilizaron como control y las otras tres recibieron manejo ecológico o convencional.

El sistema de agricultura ecológica se practica en la finca Gabeno desde hace más de diez años. El lote en donde se realizó la experiencia sostuvo una pradera durante 1996 y 1997, y en 1998 se sembró por primera vez con papa. Las prácticas incluyeron la utilización de compost, purines de chipaca (*Bidens pilosa*), ortiga (*Urtica urens*), helecho (*Pteridium aquilinum*), ajo/ají, caldos microbianos, caldo Súper 4, uso de feromonas y cultivo intercalado de cubios (*Tropaeolum tuberosum*) y rábanos (*Raphanus raphanistrum* L.) contra el gusano blanco.

Los purines son líquidos obtenidos por descomposición controlada de plantas escogidas por sus propiedades medicinales, alelopáticas o nutricionales. En ellos se encuentran principios bioquímicos y energéticos de la planta, potenciados por la acción de microorganismos que estimulan la nutrición, el crecimiento o la salud de las plantas cultivadas y previenen enfermedades y ataques de insectos (Ramírez, 1996b). Se preparan con tres partes (en peso) de la planta deseada y siete partes de agua con unos 100 ml de CMR, tapando y revolviendo diariamente.

Tabla 1. Tratamientos del experimento en los dos sistemas de cultivo.

Sistema	Ttmt	Material	Dosis (ha)	Composición* (Ingrediente activo-Toxicidad)	Función
O	E1	Purín de Chipaca	994 gl	Parcialmente Glucósido metilado chalcone	
R		Purín de Ortiga	26 L	Serotonina, Histamina	Fungicida
G		Purín de Helecho	106 L	Ecdisona	Insecticida
A		Mezcla ajo/ají	100 L		Insecticida
N		Caldo Microbiano	432 L	Bacterias, actinomices y algunos hongos	Insecticida
I		Caldo Súper 4	432 L	Sulfatos de Cu, Zn, Mg, Cal dolomita, ácido bórico, harina de hueso, estiércol, melaza e hígado de res	Activador Fertilizante
C	E2	Abono Ecológico	432 L		
O		Compost Finca	500 kg		Fertilizante
	C1	Control		Ídem, excepto Chipaca	
C		Dithane M 45	22.2 kg	Ditiocarbamato Mancozeb (3)	Fungicida
O		Manzate	27.8 kg	Carbamato Mancozeb (80%) - (3)	Fungicida
N		Curathane	5.6 kg	Carbamato Mancozeb (64%) - (3)	Fungicida
V		Antracol WP 70	17.5 kg	Ditiocarbamato Propineb (3)	Fungicida
E		Malathion	0.3 L	Organofosforado Malathion (3)	Insecticida
N		Lorsban 4EC	0.36 L	Organofosforado Clorpirifos (48%) - (3)	Insecticida
C		Curacrón	9.7 L	Organofosforado Profenofos (2)	Insecticida
I		Furadán	3.33 L	Carbamato Carbofuran (1)	Insecticida
O		Curater	0.25 L	Carbamato Carbofuran (1)	Insecticida
N		Creceer	3 kg		Fertilizante
A		Producción	11.1 kg	5-15-30 NPK	Fertilizante
L		Desarrollo	2.5 kg	Foliar NPK	Fertilizante
			10-30-10	262 kg	10-30-10 NPK
	C2	Control		ídem, excepto los fungicidas	

1 = extremadamente tóxico 2 = altamente tóxico 3 = medianamente tóxico

\* La composición de los agroquímicos se obtuvo del vademécum del cultivo de la papa, editado por Fedepapa (1996-1997) y la de los materiales ecológicos de Erazo y Sanabria (1999).

El caldo Súper 4 es una mezcla proporcional de 1 kg por material de sulfatos de cobre, cinc y magnesio, con 1 kg de ácido bórico, 60 kg de estiércol bovino fresco, 1 kg de cal dolomita, 1 kg de harina de huesos, 1 kg de hígado de res y 4 kg de melaza.

El caldo microbiano de rizosfera de finca (CMR) es un líquido que contiene microorganismos normalmente presentes en la rizosfera de plantas sanas, que mejora las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo (Ramírez, *op. cit.*). En esta experiencia los CMR se prepararon cortando y macerando raíces de plantas sanas de papa, mezcladas con yogur natural y melaza, esta última como fuente de energía. *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* son los principales microorganismos identificados en el yogur, los cuales cumplen funciones reguladoras de patógenos (Ramírez, *com.per.*)\*

El lote seleccionado en la finca San Carlos (convencional) venía de siete años de descanso y se había dedicado a praderas de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). El agricultor aplicó agroquímicos de síntesis (10-30-10, Crecer-500, Desarrollo y Producción como fertilizantes al suelo y foliares Dithane, Antracol, Manzate y Curathane como fungicidas contra la gota y Furadán, Malathion, Lorsban, Curacrom y Curater para control de insectos).

La siembra se realizó el 27 de abril de 1999 y la cosecha el 10 de noviembre. Se sembraron 30 semillas por surco (dos por sitio) en cinco surcos por parcela (para un total de 150 semillas por parcela) de la variedad local de papa Pardo Pastusa, susceptible al ataque de *Phytophthora infestans*. La preparación del suelo incluyó un pase de arado a 15-20 cm de profundidad y posteriormente se realizaron dos desyerbes con aporque en cada finca

**Metodología de análisis:** Se realizaron dos muestreos por triplicado de hojas y raíces de plantas

sanas y enfermas: el primero (M1) antes de la floración (30 de junio) y el segundo (M2) después de la floración (20 de septiembre). Se determinaron dos indicadores bioquímicos de resistencia (peroxidasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas), tanto en pared celular como en citoplasma de hojas y raíces de las plantas sanas y enfermas.

La actividad  $\beta$ -(1,3)-glucanásica se determinó siguiendo el método de Fischer *et al.* (1989), cuantificando los azúcares reductores mediante la reacción de Nelson (1944) modificada por Somogyi (1952). Los contenidos totales de peroxidasas se determinaron utilizando guaiacol como el donante de hidrógeno. Los resultados se expresan en  $\Delta$ Abs/s\*g o U/g (unidades de actividad por gramo de material).

La severidad de la gota se estableció de acuerdo con las tablas sugeridas por el CIP (Centro Internacional de la Papa), tomando al azar diez plantas por parcela y estableciendo la severidad en la escala de 1 a 9, en seis momentos de evaluación (del día 77 al 146 después de la siembra). La incidencia se determinó contando el número total de plantas afectadas por parcelas en ocho momentos de evaluación (del día 31 al 65 después de la siembra).

## RESULTADOS

### 1. Sobre la sanidad vegetal

El ataque del hongo se retrasó por lo menos hasta el día 65 después de la siembra, en las parcelas convencionales con fungicidas (C1), para cubrir el 100% de las mismas (Tabla 2), en tanto que en el control convencional (C2) se obtuvo en el día 52 y en los tratamientos ecológicos en el día 49 para E1 y 45 para E2.

Hasta el día 38 la incidencia de la enfermedad era menor en E1 que en E2 (control ecológico) e incluso que en C2 (control convencional). Ello implicaba cierto control temprano de la enfermedad debido a la chipaca.

Tabla 2. Incidencia de *P. infestans* en sistemas de cultivo ecológico y convencional de papa (1999B) (%).

Tratamiento	Días después de la siembra (DDS)							
	31	35	38	42	45	49	52	65
E1	5	11.1	13.4	44.5	96.7	100	100	100
E2	13.6	29.9	15.3	60.5	100	100	100	100
C1	6.9	13.3	10	9.9	26.4	13.7	39	100
C2	9	27.7	25.6	57.3	95.2	99	100	100

\* Ramírez, C. Comunicación personal, 2002. jijimai@hotmail.com

**Tabla 3. Variación promedio de los índices de severidad de la gota en los diferentes tratamientos durante el cultivo.**

Tratamiento	Días después de la siembra (DDS)					
	77	101	115	128	140	146
E1	3.11 b	3.53 a	4.36 a	3.38 a	5.76 ab	5.83 a
E2	3.98 ab	3.30 a	4.71 a	3.66 a	6.07 ab	5.73 a
C1	1.00 c	1.00 b	1.00 b	1.00 b	2.20 b	1.00 b
C2	5.46 a	4.23 a	4.19 a	3.44 a	6.44 a	4.75 a

a, b y c = diferencias significativas al 0.1%.

Se encontraron diferencias significativas en la evaluación de la enfermedad (Tabla 3) de las parcelas en donde se utilizó la chipaca en relación con las parcelas convencionales testigo (C2). Incluso en el día 77 DDS (julio 13) se registró un índice de severidad significativamente diferente del obtenido para C2 pero no del obtenido para las parcelas testigos del sistema ecológico. A partir del día 100 los valores tendieron a ser iguales, hasta llegar a severidades altas (entre 5 y 6) al final del cultivo.

## 2. Sobre los indicadores de resistencia sistémica

### Actividad de peroxidasas

Antes de la floración el contenido de peroxidasas fue significativamente mayor en el citoplasma de hojas de plantas enfermas que en el de hojas de plantas sanas (Tabla 4). Igualmente se detectaron diferencias significativas en el citoplasma de hojas (Tabla 5) a favor del tratamiento que no recibió ninguna protección contra *P. infestans* en la finca convencional (C2) en relación con las parcelas C1 (tratadas con agroquímicos).

En las paredes celulares de las hojas aparecieron diferencias significativas a favor de las parcelas ecológicas tratadas con chipaca (E1) en relación con

las tratadas con agroquímicos (C1), pero no entre éstos y los controles. En el citoplasma de la raíz, los análisis estadísticos revelaron igualmente que el tratamiento ecológico E1 presentaba contenidos de peroxidasas significativamente mayores que el resto de los tratamientos.

Después de la floración las peroxidasas presentaron contenidos significativamente mayores al 0.1% de confianza en los tratamientos ecológicos E1 y E2 y en el control convencional en relación con las parcelas que recibieron fungicidas (C1), tanto al nivel de pared celular como de citoplasma en las hojas de las plantas de papa (Tabla 5). Durante M2 no hubo diferencias estadísticas en los niveles de peroxidasa de plantas sanas y enfermas.

### Niveles de $\beta$ -(1,3)-Glucanasa

Antes de la floración (M1) no se encontraron diferencias estadísticas en los niveles de  $\beta$ -(1,3)-Glucanasa entre plantas sanas y enfermas, aunque sí entre tratamientos, solamente en hojas (Tabla 6). Se registraron cantidades significativamente inferiores en el citoplasma y en la pared celular de hojas en las plantas tratadas con fungicidas (C1) en relación con el resto de tratamientos.

**Tabla 4. Peroxidasas (pared celular y citoplasma) en raíces y hojas sanas y enfermas de papa con sistemas ecológico y convencional (1999B) -**

Época de muestreo	Sistema	Tratamiento	Peroxidasas (U/g)							
			Hojas sanas		Hojas enfermas		Raíces sanas		Raíces enfermas	
			Pared	Citoplasma	Pared	Citoplasma	Pared	Citoplasma	Pared	Citoplasma
Antes de Floración (M1)	ECOLÓGICO	E1( <i>Bidens pilosa</i> )	22	38	23	50	44	49	51	40
		E2(Control)	12	42	14	45	19	13	20	15
	CONVENCIONAL	C1(Fungicida)	0.06	22	1.4	31	1.5	5.4	0.2	2.4
		C2(Control)	5.3	45	13	52	0	0	0.2	1.2
Luego de Floración (M2)	ECOLÓGICO	Promedios	9.8	36.8 a	12.8	44.6 b	16.1	16.8	17.8	14.5
		E1( <i>Bidens pilosa</i> )	19	40	18	61	N.D.	18	N.D.	15
	E2(Control)	31	41	30	64	N.D.	1.5	N.D.	0.3	
	CONVENCIONAL	C1(Fungicida)	4.5	12	0	0	N.D.	6.4	N.D.	14
		C2(Control)	13.1	30	36	55	N.D.	1.7	N.D.	16
	Promedios	16	37	21	45	-	6.9	-	11.3	

N.D. = No Detectado; Promedios con letras a y b son estadísticamente diferentes al 5%.

Luego de la floración (M2), el comportamiento de las  $\beta$ -(1,3)-glucanasas reveló diferencias estadísticas al 5% a favor de las hojas enfermas en relación con las sanas (Tabla 6). En las paredes celulares se presen-

tan diferencias estadísticas en función de los tratamientos utilizados: las plantas de las parcelas control presentaron mayores contenidos de  $\beta$ -(1,3)-glucanasas que las que recibieron funguicidas (Tabla 7).

Tabla 5. Peroxidasas totales en raíces y hojas de papa con sistemas ecológico y convencional (1999B).

Época de muestreo	Sistema	Tratamiento	Peroxidasas (U/g)			
			Pared de hojas	Citoplasma de hojas	Pared de raíces	Citoplasma de raíces
Antes de floración (M1)	ORGÁNICO	E1(Bidens pilosa)	22.5a <sup>***</sup>	44.0	No detectado	44.8 a <sup>***</sup>
		E2(Control)	13.1	43.3	No detectado	14.1
	CONVENCIONAL	C1(Fungicida)	0.7 b	29.9 a <sup>**</sup>		3.9 b
		C2(Control)	9.1	48.5 b	No detectado	0.66
Luego de floración (M2)	ORGÁNICO	E1(Bidens pilosa)	18.3 a <sup>**</sup>	51.0 a <sup>**</sup>	No detectado	10.3
		E2(Control)	30.7 a	52.7 a	No detectado	0.8
	CONVENCIONAL	C1(Fungicida)	2.3 b	6.2b	No detectado	16.3
		C2(Control)	24.5 a	42.6 a	No detectado	11.5

Promedios con letras a y b dentro de una misma columna y una misma época de muestreo, son estadísticamente diferentes.

\*\*\* = 0.1%; \*\* = 1%; \* = 10%.

Tabla 6.  $\beta$ -(1,3)- glucanasas (pared celular y citoplasma) en raíces y hojas sanas y enfermas de papa con sistemas ecológico y convencional (1999B).

Época de muestreo	Sistema	Tratamiento	$\beta$ -(1,3)-glucanasas (mU/g)							
			Hojas sanas		Hojas enfermas		Raíces sanas		Raíces enfermas	
			Pared	Citoplasma	Pared	Citoplasma	Pared	Citoplasma	Pared	Citoplasma
Antes de floración (M1)	ECOLÓGICO	E1(Bidens pilosa)	382	538	297	542	237	470	252	524
		E2(Control)	440	661	294	491	259	489	319	520
	CONVENCIONAL	C1(Fungicida)	127	287	146	389	274	490	230	425
		C2(Control)	255	478	386	524	210	406	246	474
		Promedios	301	491	281	486	245	464	1262	486
Luego de floración (M2)	ECOLÓGICO	E1(Bidens pilosa)	709	871	776	1285	304	398	281	382
		E2(Control)	848	941	825	1142	525	386	288	270
	CONVENCIONAL	C1(Fungicida)	649	933	534	957	308	388	338	321
		C2(Control)	743	994	866	1159	247	297	302	394
		Promedios	687	934 a	750	136 b	346	367	302	341

Promedios con letras a y b son estadísticamente diferentes al 5%.

Tabla 7.  $\beta$ -(1,3)- glucanasas en raíces y hojas sanas y enfermas de papa con sistemas ecológico y convencional (1999B).

Época de Muestreo	Sistema	Tratamiento	$\beta$ -(1,3)-glucanasas (mU/g)			
			Pared de hojas	Citoplasma de hojas	Pared de raíces	Citoplasma de raíces
Antes de floración (M1)	ORGÁNICO	E1(Bidens pilosa)	339 a <sup>***</sup>	539 a <sup>**</sup>	244	496
		E2(Control)	366 a	576 a	289	504
	CONVENCIONAL	C1(Fungicida)	136 b	337 b	251	457
		C2(Control)	320 a	500 a	228	440
Luego de floración (M2)	ORGÁNICO	E1(Bidens pilosa)	742	1078	292	390
		E2(Control)	836 a <sup>**</sup>	1041	406	328
	CONVENCIONAL	C1(Fungicida)	591 b	945	323	354
		C2(Control)	804 a	1076	274	345

Promedios con letras a y b dentro de una misma columna y una misma época de muestreo, son estadísticamente diferentes.

\*\*\* = 0.1%; \*\* = 1%.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 1. Sobre la sanidad vegetal

El concepto aplicado en este trabajo sobre sanidad es bastante relativo, aunque útil para organizar la discusión de resultados. En efecto, el calificativo de "enferma" dado durante el primer muestreo a las plantas de papa ubicadas en las parcelas convencionales es muy relativo, porque en ese momento sólo existía un ligero ataque del hongo (severidad 1.3).

De igual manera, durante M2 la sanidad de las plantas ubicadas en las parcelas ecológicas también es relativa dado que los índices alcanzaban valores de 3.6 en las plantas "sanas" vs 7.6 en las enfermas del E1 y de 4.3 en las "sanas" del E2 versus 8.0 en las enfermas. En estos casos resultaría más apropiado señalar que se trataba de plantas menos afectadas. En los demás casos, la valoración sí resulta pertinente.

En relación con la severidad de la gota puede afirmarse que existió control eficiente y significativamente diferente de parte de los fungicidas puesto que, a pesar de tener una incidencia del 100% en las parcelas C1, ésta se tradujo solamente en una severidad promedio de grado 1, que se manifiesta como un ataque a menos del 1% del área foliar. Este grado de sanidad vegetal se mantuvo prácticamente a lo largo de toda la experiencia.

La chipaca, actuando dentro del conjunto del sistema ecológico, podría tener un efecto temprano de control de la enfermedad (aunque el análisis estadístico no muestra diferencias entre los tratamientos ecológicos, de todas maneras el índice de severidad es menor en E1 que en E2 y el hecho de constatar diferencias estadísticas entre E1 y C2 sugiere un efecto atribuible en principio a la chipaca), que desaparece durante el desarrollo del cultivo.

La pérdida de eficacia del sistema ecológico que incluyó la chipaca (E1) podría deberse o bien a situaciones de manejo del purín (preparación por los operarios, diferencias en el estado fenológico de las plantas de chipaca empleadas), falta de conocimiento sobre dosis de aplicación o bien a condiciones climáticas que pudieron incidir en el lavado rápido del producto. Esta última hipótesis es interesante de considerar puesto que los datos climáticos provenientes de la Estación Providencia (Tenjo) indican que durante el segundo semestre de 1999 se presentaron las siguientes frecuencias de días con lluvias por mes: 15 días en mayo; 22 días en junio; 7 días en julio; 14 días en agosto; 20 días en septiembre y 23 días en octubre. Tales frecuencias, es-

pecialmente altas en agosto y septiembre, pudieron incidir en el rápido lavado de la chipaca y en su relativa poca eficacia final para controlar la gota (máxime si se tiene en cuenta que no se utilizaron adherentes en su aplicación).

### 2. Sobre la actividad de peroxidasas

Los mayores niveles de actividad de peroxidasas citoplasmáticas en hojas de plantas enfermas, antes de la floración, sugieren que las plantas se defienden activando sus mecanismos bioquímicos, mientras que las papas sanas no aumentan sus niveles de actividad por posibles efectos "represores" tanto de los fungicidas como de la chipaca, en cada uno de los sistemas de agricultura en estudio.

Las peroxidasas fueron los primeros indicadores de resistencia sistémica inducida reconocidos como tales (Hammerschmidt y Smith, 1997). Estos autores indican que en 1970, Simmons y Ross detectaron aumentos en la actividad peroxidásica en tabaco como respuesta a la inoculación con TMV, comportamiento que posteriormente se confirmó en cucurbitáceas. Su acción está involucrada en numerosos procesos fisiológicos [Torres y García (*op.cit.*); Cook *et al.*, 1995].

Una posible función para la acumulación de peroxidasas en paredes celulares de plantas que desarrollan resistencia a patógenos es el entrecruzamiento de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP), que le imprimen mayor resistencia a los ataques enzimáticos (Stermer y Hammerschmidt, 1987; Hammerschmidt y Smith, *op. cit.*).

Las peroxidasas también se cree que están involucradas en la polimerización de monómeros fenólicos a lignina y suberina, entrecruzamiento de polisacáridos, regulación de niveles de auxinas y otros procesos de defensa a patógenos (Cottle y Kolattukudy, 1982; Fry, 1986; Gove y Hoyle, 1975; Vance *et al.*, 1980; Van Loon, 1992).

Es posible, entonces, que el aumento en los niveles de peroxidasas registrados en el citoplasma de hojas de las plantas enfermas en este momento se relacione con alguno de los procesos de defensa anteriormente citados.

Por otra parte, los niveles significativamente bajos de la actividad de peroxidasa citoplasmática reportados para las hojas de las plantas de papa en las parcelas C1, podrían interpretarse asumiendo que la utilización de fungicidas haría innecesaria la producción de defensas naturales en las plantas, dada su efectividad en el control del patógeno o también, como lo sugiere

Guardiola,\* que las sustancias utilizadas como coadyuvantes (que poseen aceites minerales y Tween) podrían degradar la pared celular afectando muchos receptores de membrana de carácter proteínico, resultando en una pérdida de sensibilidad del vegetal ante los estímulos del ambiente biofísico y por lo tanto en menores procesos de defensa.

Los mayores niveles de actividad de peroxidasas en la pared celular de hojas tratadas con *Bidens pilosa* en relación con las que recibieron fungicidas químicos y los mayores niveles de peroxidasas en el citoplasma de las raíces de plantas en el tratamiento E1, podrían estar confirmando las hipótesis planteadas en los párrafos anteriores sobre los efectos de los fungicidas en la no expresión de factores de resistencia y/o podrían indicar posibles efectos benéficos de los sistemas de agricultura ecológica sobre la expresión de resistencia en las plantas de papa utilizadas en este estudio.

Por otra parte, durante M2 no se encontraron diferencias estadísticas en los niveles de peroxidasas entre plantas sanas y enfermas, contrario a lo observado durante M1.

Esta ausencia de diferencias en M2 podría relacionarse con la persistencia del estado defensivo de las plantas, la producción de sustancias inhibitoras durante el estado inducido o con la incertidumbre sobre su real potencial como indicadores de ISR.

Al respecto, Dalisay y Kuc (1995) en estudios de resistencia sistémica y persistencia de la actividad de peroxidasas y quitinasas en trabajos con pepino, inoculado con el hongo *Colletotrichum lagenarium*, constataron varios procesos que pueden ayudar a explicar el comportamiento de las plantas de papa en este estudio.

En primer lugar detectaron que el nivel de resistencia disminuía con el tiempo (seis semanas después de la inducción con el patógeno). Igualmente encontraron que las actividades de peroxidasas y quitinasas fueron consistentemente mayores en la hoja 2, y en las hojas que emergieron desde el cogollo siete días después de la inoculación de la hoja 1, en plantas inducidas comparadas con aquellas tratadas con agua y que la actividad de  $\beta$ -(1,3)-glucanasas fue baja a través de plantas inducidas y plantas del testigo y no aumentó apreciablemente en hojas sobre la hoja 1 de plantas inducidas.

No obstante, en el transcurso de la experiencia, las actividades incrementadas de peroxidasas y quitinasa

en las hojas por encima de donde se realizó la inoculación no correlacionaron con los niveles de resistencia inducida.

Las actividades de peroxidasas y quitinasas fueron tanto o más altas en las hojas susceptibles de plantas no inducidas en la última parte del experimento que en las plantas inducidas siete días después del desafío con el patógeno cuando la resistencia inducida estuvo al máximo.

Los investigadores concluyeron que las señales producidas durante la primera semana después de la inoculación de la hoja 1 afectan la protección y las actividades enzimáticas de la hoja 2, de las hojas que se expanden sobre la hoja 2 y de las hojas que emergen subsecuentemente del cogollo de las plantas de pepino. Una vez disparada, la respuesta persiste, aunque reducida, en la ausencia de señales adicionales. Las actividades de peroxidasas, quitinasas y  $\beta$ -(1,3)-glucanasas consideradas individual o colectivamente, y sus patrones de isoformas, no son indicadores bioquímicos confiables para el nivel de resistencia inducida en pepino a *C. lagenarium*, previa inoculación desafiante con el hongo.

Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de aumentar la densidad de análisis bioquímicos en diferentes lapsos, con el propósito de mejorar las precisiones sobre el comportamiento de peroxidasas a través del ciclo vegetativo de las plantas.

### 3. Sobre la actividad de las $\beta$ - (1,3)-Glucanasas

El papel de las  $\beta$ -(1,3)-glucanasas, que pertenecen al grupo de las proteínas relacionadas con patogénesis denominadas PR-2, se ha identificado en relación con su habilidad para degradar las paredes celulares de los hongos (Linthorst, 1991), lo cual sugiere que pueden estar involucradas activamente en la defensa de las plantas.

Como se señaló anteriormente no se encontraron diferencias significativas en los niveles de actividad de las  $\beta$ -(1,3)-Glucanasas de plantas sanas o enfermas durante M1 pero en M2 el comportamiento de las  $\beta$ -(1,3)-Glucanasas reveló diferencias significativas entre plantas sanas y enfermas, repitiendo la tendencia encontrada durante el primer muestreo para las peroxidasas (mayores niveles en las plantas enfermas).

Las observaciones realizadas corresponden a muestreos puntuales del desarrollo vegetativo, por lo cual no es posible conocer la dinámica de estas sustancias en las plantas de los sistemas de agricultura men-

\* Guardiola, M. Comunicación personal. 2002. biotcifutopia.com

cionados y los datos presentados sólo se deben tomar como indicadores de posibles procesos, dado además que varios investigadores han reunido evidencias sobre la rapidez con la que ocurren los fenómenos de acumulación enzimática en plantas atacadas por patógenos (Fric y Huttova, 1993; Munch-Garthoff *et al.*, 1997).

Estos últimos autores, por ejemplo, afirman que la respuesta de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) atacadas por *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* incluye un incremento rápido de la actividad de  $\beta$ -(1,3)-glucanasas entre 24 y 48 horas después de la infección.

Por otra parte, Fric y Huttova (op. cit.) indican que la degradación de paredes celulares fúngicas por  $\beta$ -(1,3)-glucanasas es generalmente estimulada de manera sinérgica por quitinasa, la cual también se ha reportado como potencial agente inhibidor del crecimiento de hongos (Young y Pegg, 1982; Boekaert *et al.*, 1988; Toyoda *et al.*, 1991). En este trabajo no se determinaron quitinasas ni niveles de calosa, que también se relacionan con procesos de defensa en plantas y que pudieran explicar mejor los comportamientos señalados en las plantas de papa.

Por otra parte, las  $\beta$ -(1,3)-glucanasas presentan niveles significativamente inferiores durante M1 en citoplasma y pared celular de plantas tratadas con fungicidas (C1) en relación con el resto de tratamientos, lo cual reafirma las tendencias encontradas en las peroxidadas sobre los posibles efectos inhibidores de los fungicidas sobre la acumulación de estas sustancias como respuesta defensiva.

Finalmente, la mayor actividad de  $\beta$ -(1,3)-glucanasas en las plantas de papa de las parcelas control (C2 y E2) en relación con las que se ubicaron en parcelas con fungicidas (C1) reconfirma que, en este caso, el uso de tales sustancias tendría incidencia al menos en una reducción significativa de estas PRs.

### CONCLUSIONES

1. Durante la fase de campo el sistema de agricultura ecológica no resultó tan eficiente para el control de la gota como los fungicidas empleados en el sistema convencional. El efecto inhibitorio de *Bidens pilosa*, tal como se preparó en este estudio, se manifestó temporalmente en los momentos siguientes a su aplicación.
2. Antes de la floración, las peroxidadas se acumularon en el citoplasma de hojas de plantas enfermas. En las plantas donde se utilizaron fungicidas las peroxidadas registraron niveles menores que en los controles. Ello se ha interpretado provisionalmente como un posible efecto "represor" de los fungicidas

que, al proteger la planta, limitarían sus mecanismos de defensa. Los niveles significativamente mayores de peroxidadas en las plantas del sistema ecológico parecen confirmar esta interpretación.

3. Las  $\beta$ -(1,3)-glucanasas también aparecen en cantidades significativamente menores en los tratamientos con fungicidas antes de floración, tanto en citoplasma como en pared celular en relación con el tratamiento control. Durante el segundo período de muestreo las glucanasas también son significativamente menores en las plantas sanas en relación con las enfermas, al igual que son menores en las plantas del sistema convencional en relación con el ecológico, datos estos que ratifican la tendencia citada en la conclusión anterior.

### BIBLIOGRAFÍA

- Broekaert, W.F., Parijs, J.V., Allen, K.A., Peumans, W.J. 1988. Comparison of some molecular enzymatic and antifungal properties of chitinase from thorn-apple, tobacco and wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 319-331.
- Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony E. et al. 1995. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* 7:43-55.
- Cottle, W. and Kolattukudy, P.E. 1982. Abscisic acid stimulation of suberization. *Plant Phys.* 70: 775-780.
- Dalisay, R.F y Kuc, J.A. 1995. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Physiol Mol Plant Pathol.* 47: 313-327.
- Erazo, V. y Sanabria V.M. 1998. Caracterización de microorganismos edáficos en un cultivo biológico de papa. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Agrología.
- Federación Colombiana de Productores de Papa. 1996-1997. Vademécum del cultivo de papa. 172 p.
- Fischer, W., Christ, V. Baumgartener, M., Erismann, K.H., & Mosinger, E. 1989. Pathogenesis-related proteins of tomato. II. Biochemical and immunological characterization. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 67-83.
- Fric, F y Huttová J., 1993. Glucanase, glucan synthase and chitinase activity in barley genotypes susceptible or resistant to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Biol Plant* 35 (1): 95-101.
- Fry, S.C. 1986. Cross linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms: *Ann Rev Plant: Phys.* 37: 165-186.
- Gove, J.P and Hoyle, M.C. 1975. The isoenzymic similarity of indolacetic and oxydase to peroxidase in birch and horseradich. *Plant Phys.* 56: 684-687.
- Hammerschmidt, R. y Smith, B.J. 1997. Acquired resistance to disease in plants. *Hort Rev.* Vol. 18. Ed: Jules Janick. Pp 247-289.
- Kloeper, J.W., Tuzun, S., Liu, L., & Wei, G. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. Pages 156-165 *In*: Pest Management: Biologically Based Technologies. R.D. Lumsden and J.L. Vaughn, eds. American Chemical Society Books, Washington, DC.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden F.M. Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to Fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 655-664.



- Linthorst, H.J.M., 1991. Pathogenesis-related proteins in plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 10:123-150.
- Liu, L., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth - promoting rizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathol* 85: 1064-1068.
- Munch-Garhoff, S., Neuhaus, J.M., Boller, T., Kemmerling, B. y Kogel, K.H. 1997. Expression of B-1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near isogenic wheat lines showing *Sr5*-or *Sr24*-specified race-specific rust resistance. *Planta* 201:235-244.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 153: 257-262.
- Pieterse, C.M.J. Van Wees, S.C.M. Hoffland, E., Van Pelt, J.A., and Van Loon, L. C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis related gene expression. *Plant Cell* 8:1225-1237.
- Ramírez, C.C. 1996a. Caldo microbiano de rizosfera de finca. Guía para su preparación, uso y manejo. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. 6 p.
- Ramírez, C.C. 1996b. Purines. Herramientas útiles para proteger y mejorar cultivos. Guía para su preparación, uso y manejo. Manuscrito.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Stermer, B.A. and Hammerchmidt, R. 1987. Association of heat shock induced resistance to disease with increased accumulation of insoluble extension and ethylene synthesis. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 31: 453 - 461.
- Torres, T.E. y García, C. 1996. Realidades y perspectivas del fenómeno de resistencia sistémica inducida de plantas a fitopatógenos. Universidad Nacional de Colombia - Departamento de Sanidad Vegetal Sin publicar. 18p.
- Toyoda, H., Matsuda, Y., Yamaga, T., Ikeda, S., Morita, M., Tamai, T. Ouchi, S. 1991. Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells. *Plan Cell Rep.* 10: 217-220.
- Van Loon, L.C. 1985. Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Mol Biol.* 4 : 111-116.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann Revs Phytopathol.* 36: 453 - 483.
- Vance, C.P. Kirk., T.K. and Sherwood, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol* 18: 259 - 298.
- Young, D.H. y Pegg, G.F. 1982. The action of tomato and *Verticillium albo-atrum* glucosidases on the hyphal wall of *V. albo-atrum*. *Physiol Plant Pathol.* 21: 411-423.