

EFFECTO DEL ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO Y *Bacillus subtilis* EN LA INFECCIÓN CAUSADA POR *Cucumber mosaic virus* EN CALABACITA

E. Maldonado-Cruz¹; D. L. Ochoa-Martínez²; B. Tlapal-Bolaños¹

¹Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.
Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

²Orientación en Fitopatología. Colegio de Postgraduados.
Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.
Correo-e: ldaniel@colpos.mx (*Autor responsable).

RESUMEN

Dos conocidos agentes inductores de resistencia en las plantas, ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis*, fueron evaluados con la finalidad de conocer su efecto en la infección causada por el *Cucumber mosaic virus* (CMV) en *Cucurbita pepo* var. Zucchini grey. Se estableció un diseño experimental completamente al azar en invernadero con cinco tratamientos y ocho repeticiones: *Bacillus subtilis* aplicado al suelo, *B. subtilis* aplicado al follaje; *B. subtilis* aplicado al suelo y al follaje, ácido acetil salicílico aplicado al follaje y testigo (sin aplicación de ninguno de los productos antes indicados). Plantas de 20 días de edad fueron inoculadas mecánicamente con *Cucumber mosaic virus* y 15 días después de la inoculación se evaluaron las variables peso de biomasa fresca y concentración viral mediante la técnica de DAS-ELISA. Los resultados muestran que las plantas inoculadas con *B. subtilis* al suelo y ácido acetil salicílico tuvieron significativamente mayor peso de biomasa fresca comparados con el tratamiento Testigo ($P \leq 0.05$). Las plantas de todos los tratamientos donde se aplicó *B. subtilis* (al suelo, al follaje o al suelo y al follaje) tuvieron una concentración viral significativamente menor comparadas con el testigo ($P \leq 0.05$) en la prueba de ELISA.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: bacterias promotoras del crecimiento, resistencia sistémica adquirida, resistencia sistémica inducida, *Cucurbita pepo* var. Zucchini grey.

EFFECT OF ACETYL SALICYLIC ACID AND *Bacillus subtilis* ON *Cucumber mosaic virus* GOURD INFECTION

ABSTRACT

Acetyl salicylic acid and *Bacillus subtilis*, as resistance promoters, were evaluated on *Cucurbita pepo* cv. Zucchini grey infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV). A complete randomized experimental design with five treatments and eight replications was established under greenhouse conditions: *Bacillus subtilis* applied to soil, *B. subtilis* applied to leaves, *B. subtilis* applied to soil and leaves, acetyl salicylic acid applied to leaves, and a Control (without any treatment). Twenty days-old plants were mechanically inoculated with *Cucumber mosaic virus* (CMV) and 15 days after the inoculation, fresh plant tissue weights, and viral concentration obtained by DAS-ELISA test, were evaluated. Results showed that plants inoculated with *B. subtilis* applied to soil and those treated with acetyl salicylic acid had significantly more fresh plant tissue weight compared with Control ($P \leq 0.05$). Plants of all treatments treated with *B. subtilis* (to soil, leaves and to soil and leaves) had a significant lower viral concentration compared with Control ($P \leq 0.05$) in the DAS- ELISA test.

ADDITIONAL KEY WORDS: plant growth promoting rhizobacteria, systemic acquired resistance, systemic induced resistance, *Cucurbita pepo* cv. Zucchini grey.

INTRODUCCIÓN

Debido a su potencial destructivo y difícil manejo, las enfermedades virales de la calabaza (*Cucurbita pepo* L.) son de gran importancia en la producción comercial de este cultivo (Zitter *et al.*, 2004). El *Cucumber mosaic virus* (CMV, virus mosaico del pepino) afecta a la calabacita donde ocasiona pérdidas económicas de gran importancia (Conti *et al.*, 2000). Las enfermedades virales han cobrado gran importancia en los últimos años, debido a que su manejo se ha basado principalmente en la obtención de variedades resistentes, saneamiento y prevención sin que hasta el momento exista algún producto parecido a un viricida, con el cual se les pueda combatir con éxito una vez que las plantas están infectadas (Ponz, 2000). La resistencia sistémica es una alternativa con gran potencial de aplicación para el manejo de enfermedades virales. Actualmente, se conocen dos tipos de resistencia, la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia sistémica inducida (RSI). La RSA puede ser inducida por agentes bióticos (tales como patógenos atenuados) o abióticos (como compuestos químicos) y se asocia al incremento de la concentración de la fitohormona salicilato y a la producción de proteínas relacionadas con patogénesis (PRP). La RSI es estimulada por rizobacterias promotoras del crecimiento y se asocia a la mayor sensibilidad a las fitohormonas etileno y jasmonato sin producción de proteínas relacionadas con patogénesis. Ambos mecanismos pueden resultar en una resistencia general de las plantas hacia diversos patógenos (Pieterse *et al.*, 1996; Kloeppe *et al.*, 2004).

Se sabe que plantas de tabaco resistentes al *Tobacco mosaic virus* (TMV) sintetizan diversas proteínas relacionadas con patogénesis (PRP) poco después de la infección y que la aplicación exógena de ácido acetil salicílico (AAS) induce la expresión de los genes que sintetizan éstas PRP y con ello la resistencia de las plantas al virus (Malamy *et al.*, 1990) u otros fitopatógenos como bacterias y hongos (Chivasa *et al.*, 1997). En calabacita se ha encontrado que el ácido acetil salicílico podría funcionar como un compuesto que transmite la señal de resistencia contra el *Tobacco necrosis virus* (Metraux *et al.*, 1990). Diversas especies de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* han sido utilizadas para inducir resistencia sistémica contra enfermedades producidas por diferentes hongos, bacterias, nematodos y virus en cultivos como jitomate, pepino, chile y cacahuate (Vallad y Goodman, 2004). La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de *Bacillus subtilis* y el ácido acetil salicílico contra *Cucumber mosaic virus* en plantas de calabacita (*Cucurbita pepo* L. var. Zucchini grey) y proporcionar evidencia indirecta de que los mecanismos de resistencia (RSA y RSI) pueden ser activados en esta variedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el invernadero de Virología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola

de la Universidad Autónoma Chapingo ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México.

Siembra y trasplante de calabacita

Se sembraron semillas de calabacita variedad Zucchini grey de la empresa Caloro®, en charolas de plástico negro de 128 cavidades conteniendo un sustrato estéril (peat-moss). La charola fue regada diariamente hasta la emergencia de las plántulas y después cada tres o cuatro días de acuerdo con la humedad observada en el sustrato. Una vez emergidas las plántulas, éstas se trasplantaron a vasos de unicel de 500 ml de capacidad que contenían suelo de monte esterilizado con bromuro de metilo.

Aplicación de tratamientos

Se establecieron cinco tratamientos bajo un diseño completamente al azar con ocho repeticiones (plantas de calabacita) cada uno. Los tratamientos evaluados fueron: a) *Bacillus subtilis* aplicado al suelo; b) *B. subtilis* aplicado al follaje; c) *B. subtilis* aplicado al suelo y al follaje; d) ácido acetil salicílico aplicado al follaje (AAS) y e) testigo.

En el caso de *Bacillus subtilis*, se utilizó el producto comercial Biologic® (Gustafson LLC, USA), el cual consiste en un concentrado soluble de esta bacteria más ácidos húmicos. Este producto se aplicó al sustrato de germinación de la semilla en el almácigo a una dosis de 5 ml·litro⁻¹ de agua con un aspersor manual a partir del momento de la siembra, y posteriormente, al suelo una vez realizado el trasplante de las plántulas. En el caso de la aplicación al follaje, las aspersiones se realizaron hasta punto de goteo a una dosis de 5 ml·litro⁻¹ de agua con un aspersor manual a partir del momento de la emergencia de las plántulas y hasta el final del experimento. La aplicación simultánea del producto al suelo y al follaje se realizó en la forma, dosis y tiempos antes indicados. El AAS se aplicó al follaje hasta punto de goteo a una dosis de 1 g·litro⁻¹ de agua con un aspersor manual a partir del momento de la emergencia de las plántulas. En este caso el AAS fue diluido primeramente en aproximadamente 2 ml de alcohol etílico 96 %, y posteriormente, en el agua. En todos los casos anteriores, la aplicación de los productos se realizó cada tercer día hasta el momento de la evaluación del experimento. Debido al tamaño de las plantas, durante la etapa de almácigo y las tres primeras semanas después del trasplante se prepararon 50 ml de cada producto y posteriormente 100 ml hasta la evaluación del experimento. El tratamiento testigo consistió en plantas de calabacita inoculadas con CMV sin aplicación de los productos antes indicados.

Inoculación del *Cucumber mosaic virus*

Las plantas de todos los tratamientos fueron inoculadas mecánicamente con *Cucumber mosaic virus* a los 20 días de edad (tres días después del trasplante), utilizando como fuente de inóculo 2 g de tejido foliar aproximadamente de

una planta de tabaco infectada con dicho virus que mostraba síntomas de mosaico, el cual fue macerado en una solución amortiguadora de fosfatos 0.025M pH 7.2 + DIECA (ácido dietilditiocarbámico).

Variables evaluadas

Con el propósito de conocer si existían diferencias en el peso de biomasa fresca de las plantas de cada tratamiento, a los 18 días después de la inoculación del CMV, con unas tijeras de podar se cortaron ocho plantas a la altura del cuello de cada uno de ellas y se metieron en bolsas de plástico previamente etiquetadas con el nombre del tratamiento para su traslado al laboratorio. En laboratorio se pesó cada planta de manera individual en una balanza granataria.

El tejido foliar de las ocho plantas de cada tratamiento fue sometido a la prueba de DAS-ELISA siguiendo el protocolo establecido por el proveedor de los antisueros (AGDIA, USA) para detectar de manera cuantitativa al *Cucumber mosaic virus* en cada una de ellas. Al final de la prueba se registraron los valores de absorbancia en un lector de ELISA Dynatech, Minireader II a 405 nm obtenidos en cada una de las plantas de los diferentes tratamientos. El criterio utilizado para discriminar muestras positivas fue el propuesto por Peralta y Frías (1987) consistente en la media más dos veces la desviación estándar de los testigos negativos.

Análisis estadístico

La homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos fue comprobada en el paquete estadístico MINITAB 13.1 para las variables peso de biomasa fresca ($P \leq 0.05$) y absorbancia ($P \leq 0.05$). El análisis de la varianza se realizó utilizando el modelo general lineal (MGL). Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Todos los cálculos se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS 8.1.

RESULTADOS

Peso de biomasa fresca

Los resultados del análisis de la varianza del peso de biomasa fresco mostró diferencias significativas entre las plantas tratadas con *B. subtilis*, ácido acetil salicílico y el testigo ($P \leq 0.05$). Las plantas de calabacita que fueron tratadas con *B. subtilis* aplicado al suelo y ácido acetil salicílico aplicado al follaje tuvieron mayor tamaño y peso de biomasa fresca comparadas con el tratamiento testigo (Cuadro 1, Figura 1).

Concentración viral

De acuerdo con el criterio de Peralta y Frías (1987) utilizado en esta investigación, el valor umbral para determinar

CUADRO 1. Peso de biomasa fresca en plantas de calabacita registrado a los 15 días después de la inoculación con *Cucumber mosaic virus* y tratadas con *Bacillus subtilis* y ácido acetil salicílico.

Tratamiento	Promedio de peso de biomasa fresca (g)*
Ácido acetil salicílico aplicado al follaje	21.3 a
<i>Bacillus subtilis</i> aplicado al follaje	17.2 ab
<i>Bacillus subtilis</i> aplicado al suelo	21.4 a
<i>Bacillus subtilis</i> aplicado al suelo y al follaje	18.9 ab
Testigo inoculado sin ningún producto	14.3 b

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

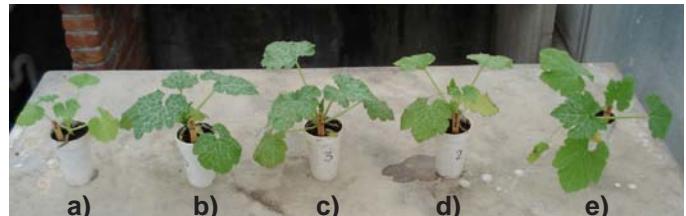


FIGURA 1. Apariencia de plantas de calabacita a los 15 días después de la inoculación con *Cucumber mosaic virus* y tratadas con diferentes productos (de izquierda a derecha): a) Testigo inoculado sin aplicación de producto, b) Ácido acetil salicílico aplicado al follaje, c) *Bacillus subtilis* aplicado al suelo y al follaje, d) *Bacillus subtilis* aplicado al follaje y e) *Bacillus subtilis* aplicado al suelo.

a una muestra como positiva fue de 0.347 unidades de absorbancia a 405 nm. Con base en lo anterior, sólo los tratamientos de ácido acetil salicílico aplicado al follaje y el testigo fueron positivos al CMV (Cuadro 2).

El análisis de varianza de la absorbancia mostró diferencias significativas entre las plantas tratadas con *B. subtilis*, ácido acetil salicílico y testigo ($P \leq 0.05$). Las plantas de calabacita que fueron tratadas con *B. subtilis* aplicado al suelo, al follaje y la aplicación simultánea al suelo y al follaje tuvieron valores de absorbancia menores al testigo no tratado (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que *B. subtilis* aplicado al suelo y ácido acetil salicílico aplicado al follaje incrementaron significativamente el peso de biomasa fresca de plantas de calabacita var. Zucchini grey. Resultados similares se han reportado con plantas de pepino infectadas con *P. syringae* pv. *lachrymans* y tratadas con *Bacillus subtilis* cepa GB03, *Bacillus pumilus* INR7 y *Curtobacterium flaccumfaciens* con la finalidad de evaluar resistencia sistémica inducida y severidad, donde se observó una promoción significativa del crecimiento en las plantas inoculadas con estas bacterias comparada con el tratamiento testigo que no fue tratado (Raupach y Kloepfer, 2000).

CUADRO 2. Absorbancia a 405 nm obtenidos en la prueba de DAS-ELISA en plantas de calabacita 15 días después de ser inoculadas con *Cucumber mosaic virus* y tratadas con *Bacillus subtilis* y ácido acetil salicílico.

Tratamiento	Resultado de la prueba DAS-ELISA	Absorbancia (405 nm)*
Ácido acetil salicílico aplicado al follaje	Positivo	0.397 a
<i>Bacillus subtilis</i> aplicado al follaje	Negativo	0.269 b
<i>Bacillus subtilis</i> aplicado al suelo	Negativo	0.294 b
<i>Bacillus subtilis</i> aplicado al suelo y al follaje	Negativo	0.295 b
Testigo inoculado sin producto	Positivo	0.349 ab

*Medias con la misma letra son similares de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Por otro lado, un valor muy alto en peso de biomasa fresca y similar al del tratamiento *Bacillus subtilis* aplicado al suelo se obtuvo en el tratamiento con ácido acetil salicílico. Este comportamiento es diferente del reportado por López y Scott (1997) quienes mencionan que el crecimiento del tallo de explantes de papa se inhibe con la aplicación de ácido acetil salicílico a una concentración de 0.018 a 0.180 g·litro⁻¹, o bien, en el caso del frijol donde al aplicar 0.25 a 0.5 g·litro⁻¹ de ácido acetil salicílico se registró una fuerte pérdida de peso de discos foliares de esta especie que no se observó cuando se utilizó una concentración de 0.1 g·litro⁻¹ (Canakci, 2003).

Las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* aplicado al follaje tuvieron un peso de biomasa fresca inferior al registrado en el caso de la aplicación de *Bacillus subtilis* al suelo. Lo anterior se debe a que las bacterias del género *Bacillus* son habitantes comunes del suelo y no del follaje (Olsen y Baker, 1967). Se esperaba que la aplicación simultánea de *Bacillus subtilis* al suelo y al follaje incrementara el peso de biomasa fresca al incrementar la superficie de contacto de esta bacteria con la planta que pudiera influir en un mayor estímulo de los mecanismos de defensa.

El menor peso de biomasa fresca registrado en el tratamiento testigo puede atribuirse a la infección viral, ya que se sabe que uno de los efectos de estos patógenos en las plantas es precisamente una disminución en su crecimiento. Plantas infectadas por *Cucumber mosaic virus* pueden quedar achaparradas en grado considerable o morir por la infección ocasionada por el virus (Agrios, 2004). En el caso del pepino, se observa que a los cuatro o cinco días después de haberse producido la inoculación con *Cucumber mosaic virus*, todo crecimiento posterior disminuye drásticamente y las plantas se quedan enanas, debido a que los entrenudos y pecíolos del tallo se acortan y a que las hojas se desarrollan sólo a la mitad de su tamaño normal (Conti *et al.*, 2000). La infección causada por el *Cucumber mosaic virus* ocasiona una disminución del crecimiento en plantas de calabacita (Agrios, 2004).

Los tratamientos en los que se aplicó *Bacillus subtilis* resultaron negativos al *Cucumber mosaic virus* en la prueba de DAS-ELISA y sus valores de absorbancia fueron muy

similares entre sí y diferentes estadísticamente de los registrados en los tratamientos testigo y ácido acetil salicílico. De acuerdo con van Loon *et al.* (1998), las bacterias promotoras del crecimiento, como *Bacillus* sp., constituyen uno de los diversos grupos de microorganismos asociados a las plantas con el potencial de inducir mecanismos de defensa. En este sentido, los bajos valores de absorbancia observados en las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* pueden ser el resultado de la inducción de los mecanismos de resistencia en la planta, inhibición en la replicación viral o a su dilución por efectos de crecimiento de la planta.

Por otro lado, se observó que la aplicación del ácido acetil salicílico al follaje no afectó la concentración de *Cucumber mosaic virus* comparadas con el testigo. Adicionalmente, se observó un incremento en el crecimiento de las plantas. Esta combinación tiene un potencial negativo en el manejo de la enfermedad provocada por CMV en el cultivo de calabacita en campo, pues estas plantas servirían como fuente de inóculo.

Por el contrario, las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* (ya sea al suelo o al follaje) tuvieron un mayor peso de biomasa fresca comparado con el testigo y además resultaron negativas a *Cucumber mosaic virus* (Cuadro 2). No obstante, es más conveniente la aplicación de *Bacillus subtilis* al suelo ya que puede obtenerse un mayor peso de biomasa fresca y una disminución considerable de la concentración del *Cucumber mosaic virus* en las plantas con la ventaja adicional de su fácil aplicación y menor costo comparado con la aplicación simultánea de esta misma bacteria al suelo y al follaje.

CONCLUSIONES

La aplicación de *Bacillus subtilis* redujo la concentración de *Cucumber mosaic virus* en plantas de calabacita. El ácido acetil salicílico no afectó la concentración de *Cucumber mosaic virus* en plantas de calabacita. La aplicación de *Bacillus subtilis* al suelo y ácido acetil salicílico al follaje a plantas de calabacita var. Zucchini incrementó el peso de biomasa fresca. La aplicación de *Bacillus subtilis* aumentó el crecimiento y redujo la concentración de *Cucumber mosaic virus* en calabacita.

LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N. 2004. Plant Pathology. 5th ed. Ed. Academic Press. San Diego, California. USA. 952 p.
- CANAKCI, S. 2003. Effects of acetyl salicylic acid on fresh weight pigment and protein content of bean leaf discs (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Biologica Hungarica* 54: 385-392.
- CHIVASA, S.; MURPHY, A. M.; NAYLOR, M.; CARR, J. P. 1997. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylyhydroxamic acid-sensitive mechanism. *The Plant Cell* 9: 547-557.
- CONTI, M.; GALLITELLI, D.; LISA, V.; LOVISOLLO, O.; MARTELLI, G. P.; RAGOZZINO, A.; RANA, G. L.; VOVLAS, C. 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Traducido al español de J. M. MATEO BOX. Edit. Ediciones Mundi Prensa. España. 206 p.
- KLOEPPER, J. W.; CHOONG-MIN, R.; ZHANG, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1260-1266.
- LÓPEZ, D. H.; SCOTT, I. M. 1997. Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *Journal of Plant Physiology* 151: 74-78.
- MALAMY, J.; CARR, J. P.; KLESSIG, D. F.; RASKIN, I. 1990. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*: 1002-1004.
- METRAUX, J. P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WRAD, E.; WYSS-BENZ, M.; GAUDIN, J.; RASCHDORF, K.; SCHMID E.; BLUM, W.; INVERARDI, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*: 1004-1006.
- OLSEN, C. M.; BAKER, K. F. 1967. Selective heat treatment of soil, and its effect on the inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 58: 79-87.
- PERALTA, E. L.; FRÍAS, M. T. 1987. Manual sobre la técnica inmunoenzimática ELISA. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana, Cuba. 71 p.
- PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; HOFFLAND, E.; VAN PEEL, J. A.; VAN LOON L. C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell* 8: 1225-1237.
- PONZ, F. 2000. Resistencia a virus de plantas, pp. 101-118. In: *Patología Vegetal*. G. LLÁCER; M. M. LÓPEZ; A. TRAPERO; A. BELLO (eds.). Ed. Phytona-España S. L. España.
- RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. 2000. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Disease* 84: 1073-1075.
- VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H.; PIETERSE, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-83.
- ZITTER, A. T.; HOPKINS, D. L.; THOMAS, C. E. 2004. Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. The American Phytopathological Society. Edit. Ediciones Mundi Prensa. España. 87 p.