

Mecanismo de acción de IDAI Cobre para reducir la incidencia de *Pseudomonas syringae* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Ana Isabel González-Hernández, Eugenio Llorens, Begonya Vicedo, Pilar García-Agustín y Leonor Lapeña (Grupo de Bioquímica y Biotecnología, Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universitat Jaume I de Castellón).

Teresa Yuste, Antonio Cerveró, y Carlos Ledó (Departamento I+D+i, Dpto. Técnico, Director General IDAI Nature S.L.).
Carlos Agustí-Brisach (Asesoría Científico-Técnica a IDAI Nature S.L.; Grupo Patología Agroforestal, Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba).

INTRODUCCIÓN

El formulado de Cu complejo con ácido heptaglucónico desarrollado por IDAI Nature se caracteriza por presentar una alta asimilabilidad por parte de la planta. En este trabajo, se dilucida el mecanismo de acción del Cu complejo utilizando el patosistema *Solanum lycopersicum* vs. *Pseudomonas syringae*, sobre el que tras diversos tratamientos se evaluarán parámetros fisiológicos, liberación de especies reactivas de oxígeno, rutas hormonales y compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos indican que esta solución es capaz de inducir los mecanismos de defensa de la planta, resultando en una reducción de la incidencia de *P. syringae* en más de un 50% en plantas de tomate, y que la presencia del propio Cu, junto con el incremento del ácido clorogénico, podrían generar la protección de la planta frente al patógeno.

La acción de determinadas moléculas como inductoras de crecimiento y/o de defensa de las plantas frente a patógenos es un campo que está experimentando actualmente un gran desarrollo. Para entender la interacción de la planta con las moléculas utilizadas y poder predecir el comportamiento frente a los tratamientos en campo, previamente es necesario conocer la respuesta de la planta a nivel fisiológico, metabolómico y estructural en respuesta al producto aplicado.

La empresa IDAI Nature desarrolla y ofrece soluciones naturales elaboradas a partir de extractos botánicos y minerales, con el fin de obtener frutas y verduras libres de residuos. Además de un carácter bioestimulante, estas soluciones permiten aumentar el rendimiento del cultivo y son capaces de incrementar la resistencia de las plantas frente a diferentes estreses, entre ellos los ocasionados por el ataque de microorganismos fitopatógenos. Una de las soluciones más innovadoras y de mayor éxito de la empresa es IDAI Cobre, formulado a base de ion Cu^{2+} complejo con ácido heptaglucónico. Este agente complejante le confiere al metal una alta asimilabilidad por la planta, permitiendo disminuir las dosis de sus aplicaciones en campo, y con ello, reducir las concentraciones de cobre metal en el medio ambiente. Con el fin de profundizar en el estudio y conocimiento sobre su modo de acción,

se han abordado diversos ensayos en condiciones controladas en colaboración con el Grupo de Bioquímica y Biotecnología del departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la 'Universitat Jaume I' (UJI) de Castellón.

Para ello, mediante el uso del patosistema *Solanum lycopersicum* vs. *Pseudomonas syringae*, se han estudiado las diferentes rutas de respuesta de

la planta frente a esta bacteria tanto a nivel hormonal como respuesta oxidativa. Se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) var Ailsa Craig de cuatro semanas de edad, regadas con solución de Hoagland y cultivadas con fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad, a $21 \pm 3^\circ\text{C}$ y 80% de HR, que se consiguió manteniéndolas en el interior de contenedores de plástico. Como inóculo se utilizó la bacteria *P.*

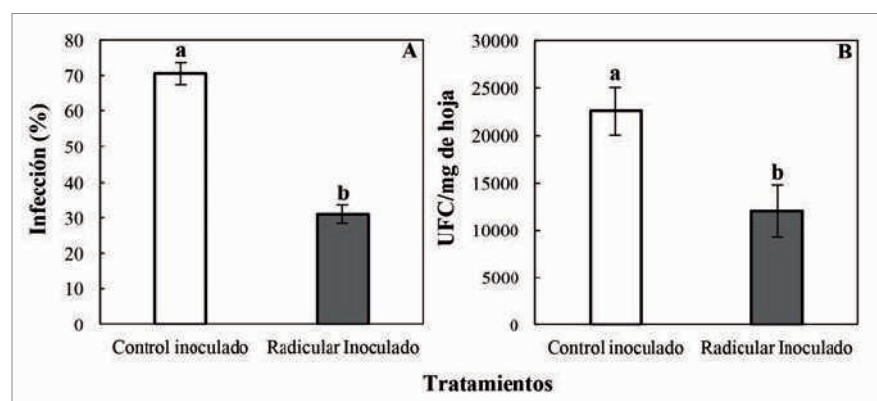


Figura 1. Efecto del producto sobre *Pseudomonas syringae* en planta en los tratamientos control sin tratar inoculado (control positivo), y tratamiento radicular inoculado. A, Grado de infección representado como porcentaje de la superficie de la hoja afectada con síntomas; B, Supervivencia de la bacteria en UFC/mg de hoja. Para cada parámetro evaluado, las columnas representan los valores medios de tres repeticiones de cada tratamiento (10 plantas por repetición y tratamiento), y las barras verticales el error estándar de las medias. Letras diferentes representan valores con diferencias significativas de acuerdo con el test LSD de Fisher para $P < 0,05$.

syringae patovar 'tomato', cepa DC3000, ajustada a una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. Se inocularon la tercera y cuarta hoja verdadera de cada planta, sumergiéndolas en la suspensión bacteriana durante 3 s. El producto fue aplicado según las indicaciones correspondientes, ajustando el pH al de la solución de riego. Se evaluaron los siguientes tratamientos: *i*, plantas control sin tratar y sin inocular (control negativo); *ii*, plantas control sin tratar e inoculadas (control positivo); *iii*, plantas tratadas vía radicular sin inocular; y *iv*, plantas tratadas vía radicular e inoculadas. Todos los tratamientos se aplicaron con finalidad bioestimulante, realizándose 72 horas antes de la inoculación. Como diseño experimental, para cada tratamiento se utilizaron 10 plantas que se distribuyeron al azar en el interior de los contenedores plásticos utilizados para su incubación. El experimento se repitió tres veces. El efecto de los tratamientos se evaluó mediante el análisis de parámetros fisiológicos, determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS; peróxido de hidrógeno, H_2O_2) y análisis de niveles de hormonas implicadas en la defensa de las plantas.

Los parámetros fisiológicos estimados fueron la altura de las plantas y el peso seco de la parte aérea y radicular, obtenido tras el secado en horno de las muestras a $60^\circ C$ durante 72 horas. Ambos parámetros fisiológicos se midieron al final del experimento, a las 72 horas post-inoculación (hpi). Además, para el estudio del efecto del tratamiento en la infección, 72 hpi también se valoró visualmente la severidad de ésta comparando las plantas tratadas y las no tratadas, mediante el estudio del fenotipo de la enfermedad [nivel de infección de cada uno de los folíolos (%)] y realizando un conteo de colonias en placas de King B con el antibiótico selectivo que permitía determinar el efecto del tratamiento sobre las poblaciones bacterianas.

La respuesta de la planta al tratamiento se valoró 48 hpi mediante análisis de la liberación de ROS, hormonas y compuestos fenólicos en hojas. El primero de estos tres parámetros es uno de los mecanismos de defensa de las plantas frente al patógeno, puesto que estas especies reactivas son tóxicas para el patógeno. Por tanto, ante la posible inducción de defensa de la planta por parte de un tratamiento o molécula, se procedió a la evaluación de las cantidades de ROS en plantas tratadas para comprobar si este es uno de los mecanismos potenciados por el tratamiento. Además, para dilucidar el efecto de los tratamientos en el metabolismo de la planta se evaluaron los niveles de las hormonas ácido abscísico (ABA), ácido Indolacético (IAA), precursor del ácido Jasmónico (OPDA) y Ácido Salicílico (SA); y



Figura 2. Fenotipo de la infección causada por *Pseudomonas syringae* en (A) hojas de tomate de plantas control inoculadas y no tratadas con Cu complejado, y en (B) hojas tratadas con Cu complejado vía radicular, 42 hpi.

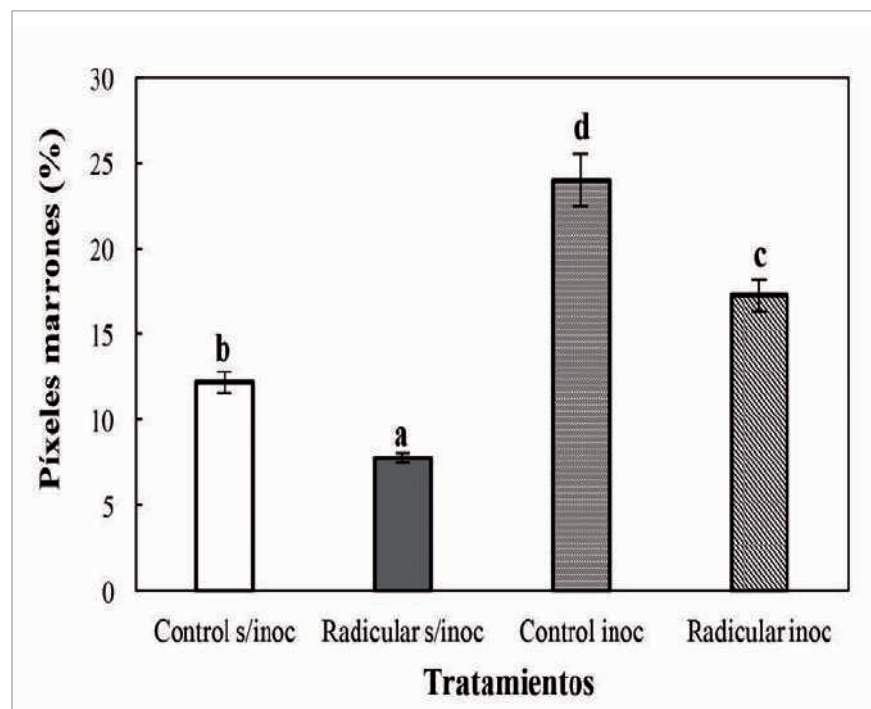


Figura 3. Cuantificación de la acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; ROS) valorado en píxeles teñidos (%) en muestras de hojas de tomate tomadas 48 hpi para los cuatro tratamientos evaluados: *i*) control sin tratar y sin inocular, *ii*) tratamiento radicular con Cu complejado sin inocular; *iii*) control sin tratar e inoculado; y *iv*) tratamiento radicular con Cu complejado e inoculado. Las columnas representan los valores medios de tres repeticiones de cada tratamiento (10 plantas por repetición y tratamiento), y las barras verticales el error estándar de las medias. Letras diferentes representan valores con diferencias significativas de acuerdo con el test LSD de Fisher para $P < 0,05$.

Tratamiento	ABA	IAA	OPDA	SA	Ac. cafeico	Ac. clorogénico
Control s/inoc	3320,3 ± 403,8 ^a	230,2 ± 19,8 a	77,8 ± 77,8 a	507,7 ± 187,5 a	9405,1 ± 788,6 a	205,9 ± 197,8 a
Control inoc.	3479,6 ± 531,5 a	340,0 ± 66,9 a	437,6 ± 138,1 b	820,9 ± 281,2 a	17011,2 ± 2277,1 b	0 ± 0
Radicular s/inoc	3248,4 ± 683,6 a	223,9 ± 12,9 a	173,8 ± 87,4 ab	996,7 ± 388,5 a	14798,5 ± 3042,6 ab	5721,0 ± 5431,9 b
Radicular inoc.	3786,6 ± 349,7 a	258,4 ± 0,7 a	336,7 ± 12,1 c	1206,3 ± 416,9 a	18160,9 ± 2184,9 b	5802,4 ± 3515,5 b

Tabla 1. Efecto de los tratamientos con Cu complejoado sobre los niveles (ng/g dw) de hormonas ácido absísico (ABA), ácido indolacético (IAA), precursor del ácido Jasmónico (OPDA) y ácido Salicílico (SA); y de los compuestos fenólicos cafeico y clorogénico.

^aLos datos representan la media de tres repeticiones independientes de 10 plantas cada una ± el error estándar de las medias; ^bLetras diferentes en una misma columna representan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test LSD de Fisher para P < 0,05.

de los compuestos fenólicos cafeico y clorogénico. Todos estos parámetros se midieron según lo descrito por Llorens y col. (2015, 2016).

Todos los datos obtenidos fueron sometidos a rigurosos análisis estadísticos utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. Se comprobó que no existían diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los datos de las diferentes repeticiones, por lo que, para cada experimento, los datos de las tres repeticiones se analizaron conjuntamente. Se realizaron test de normalidad y análisis de ANOVA para los grupos de población que seguían una distribución normal, así como análisis de ANCOVA para los grupos que seguían un modelo de regresión lineal. Las medias se separaron utilizando el test de mínimas diferencias de Fisher para $P < 0,05$.

Las plantas de tomate tratadas vía radicular con Cu complejoado mostraron un porcentaje de infección significativamente menor ($\approx 30\%$) que las plantas control inoculadas sin tratar ($\approx 70\%$) (Figura 1A; Figura 2). Este mismo patrón de comportamiento se observó cuando se evaluó la cantidad de inóculo de la bacteria en las hojas inoculadas, siendo alrededor de 12.000 y 22.500 UFC/mg de hoja para los tratamientos radiculares y control, respectivamente (Figura 1B). Sin embargo, en cuanto a los parámetros fisiológicos medidos, aunque las plantas tratadas con Cu complejoado mostraron mayores valores de altura y peso seco, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas respecto al control. Aunque este resultado apunta a que las aplicaciones de Cu complejoado no exacerban significativamente el crecimiento y desarrollo de la planta, sería necesario realizar estudios más exhaustivos mediante el uso de otros patosistemas de referencia para corroborar este resultado. Sin embargo, cabe destacar que las aplicaciones de este producto son capaces de inducir los mecanismos de

defensa de la planta frente a estreses causados por el ataque de microorganismos fitopatógenos.

Respecto a la respuesta de la planta al tratamiento, la liberación de ROS provoca daños en los tejidos vegetales, que son los que se cuantifican. Por ello, bajos niveles de H_2O_2 indicarían que la planta está sufriendo menos daño, mientras que niveles altos indican que la planta está siendo afectada. Se demostró que los tratamientos con Cu complejoado disminuyen estos depósitos tanto en presencia del patógeno como en ausencia de éste (Figura 3). Teniendo en cuenta la reducción de la infección observada, se puede considerar que el efecto del tratamiento es anterior a la respuesta oxidativa. Ello implica que las plantas tratadas presentan un menor daño tisular y puede repercutir positivamente en ellas a otros niveles.

Por otro lado, los resultados del análisis de los niveles de las hormonas implicadas en rutas de defensa apuntan a que ninguna de ellas está implicada en la inducción de defensa por el tratamiento con Cu complejoado. En ningún caso el tratamiento provocó cambios significativos en las hormonas detectadas, excepto para el OPDA (Tabla 1). Ello podría indicar que la defensa de la planta frente al patógeno se está produciendo antes de que la bacteria llegue a afectar a la célula vegetal. Para comprobar esta hipótesis se procedió al análisis de compuestos fenólicos, que pueden afectar directamente a la bacteria debido a su toxicidad, o reforzar la pared celular impidiendo la entrada de toxinas. El análisis de los compuestos fenólicos demostró que el tratamiento induce la formación del ácido clorogénico tanto en presencia como en ausencia de la bacteria (Tabla 1). Teniendo en cuenta su poder tóxico, podría estar ayudando a que la planta se defienda frente a la infección de poblaciones bacterianas.

Como conclusión de este trabajo, es importante destacar que IDAI Cobre aplicado por riego consigue activar los mecanismos de defensa de la planta reduciendo la incidencia de *P. syringae* en más de un 50%, siendo la presencia del propio Cu la que podría generar, junto con el incremento del compuesto fenólico ácido clorogénico, una activación de este mecanismo frente al patógeno. Cabe destacar que el ácido clorogénico juega un papel importante en la protección de cultivos frente a microorganismos fitopatógenos e incluso para repeler el ataque de herbívoros en plantas (Leiss y col. 2009).

Agradecimientos: Este estudio ha sido subvencionado por el plan de Ayudas del Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial (IVACE) Ref. IFINOA/2014/46. C. Agustí-Brisach disfruta de una beca Juan de la Cierva-Formación financiada por el MINECO en el Grupo Patología Agroforestal (UCO).

BIBLIOGRAFÍA

- Leiss, K. A., Maltese, F., Hae Choi Y., Verpoorte R., y Klinkhamer P., 2009. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for Thrips in Chrysanthemum. *Plant Physiology*, 150 (3): 1567-1575.
- Llorens, E., Agustí-Brisach, C., González-Hernández, A. I., Troncho, P., Vicedo, B., Ledó, C., Yuste, T., Orero, M., García-Agustín, P. y Lapeña, L., 2016. Bioassimilable Sulfur Provides Effective Control of *Oidium neolycopersici* in Tomato Enhancing Plant Immune System. *Pest Management Science*, 73: 1017-1023.
- Llorens, E., Scalschi, L., Fernández-Crespo, E., Lapeña L., y García-Agustín, P., 2015 Hexanoic acid provides long-lasting protection in 'Fortune' mandarin against in Physiological and Molecular Plant Pathology, 91: 38-45