

Tesis de Posgrado

Mecanismos de defensa en *Helianthus annuus* L. frente al ataque del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary

Bazzalo, María Eugenia

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bazzalo, María Eugenia. (1986). Mecanismos de defensa en *Helianthus annuus* L. frente al ataque del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1985_Bazzalo.pdf

Cita tipo Chicago:

Bazzalo, María Eugenia. "Mecanismos de defensa en *Helianthus annuus* L. frente al ataque del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1985_Bazzalo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis 1985

ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Mecanismos de defensa en Helianthus annuus L. frente al ataque del hongo
Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary.

Autor: María Eugenia Bazzalo

Director: Dr. Osvaldo Héctor Caso

Trabajo realizado en el Centro de Ecofisiología Vegetal (CONICET-FECIC-
FUND. M. LILLO).

Tesis 1985
ej. 2

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

A Pedro,

A mis padres,

Al Dr. J. E. Wright ,quien me contagi6 su
profundo amor a la Biología.

AGRADECIMIENTOS

La cristalización de mi tema de Tesis dentro del área de la Fisiopatología Vegetal constituyó desde el comienzo un importante desafío, dado su escaso desarrollo en la Argentina y su gran complejidad. Agradezco en tal sentido al Dr. Osvaldo H. Caso su confianza al brindarme la oportunidad de trabajar dentro de esta orientación de mi preferencia, y el haber dirigido mi trabajo. Igualmente al Ing. F. Nome quien delimitó un problema de importancia como es la podredumbre basal del Girasol, y aportó un primer enfoque para su estudio, así como opiniones y sugerencias de gran valor.

El carácter interdisciplinario del problema motivó la necesidad de recurrir a numerosos investigadores, quienes contribuyen con toda generosidad en diversos aspectos y me respaldaron en los momentos de mayor dificultad. Deseo en tal sentido agradecer a: la Dr. M. Alcubilla Martín por la elaboración del proyecto inicial, y el gran entusiasmo y ejemplo de orden y rigurosidad que me transmitió; a la Dra. M.A. Del Pero de Martínez por su asesoramiento en los aspectos bioquímicos y su constante apoyo; al Ing. D. Ginzo por la lectura de este trabajo y las opiniones críticas que me brindó durante todo el desarrollo del mismo y al Ing. E. Teyssandier, especialista en el tema, quien aportó generosamente su experiencia en los aspectos patológicos y posibilitó los estudios realizados sobre materiales cultivados a campo.

Deseo también destacar en forma expresa, la activa participación en la realización de este trabajo de la Lic. E. Heber, quien enriqueció la tarea con su permanente entusiasmo y compañerismo. A ella, y a la Sra. Y. Torres quien a través de su invaluable dedicación al trabajo allanó numerosos aspectos técnicos, les agradezco su amistad y los gratos momentos compartidos.

Agradezco a la Sra. N. Martínez el mecanografiado de este trabajo, y a la Sra. C. Dizeo su colaboración en las técnicas anatómicas.

Finalmente, deseo expresar mi reconocimiento al CONICET que me brindó la posibilidad y los medios necesarios para llevar a cabo mis investigaciones, a través de las becas que me otorgara.

Resultados parciales, surgidos durante la realización de este trabajo han sido presentados en comunicaciones a reuniones de la Soc. Arg. de Fisiología Vegetal, y publicados en forma completa en actas de conferencias Latinoamericana de Fitopatología e Internacional de Girasol. Asimismo, parte de los resultados se han publicados en una revista de difusión internacional.

Los trabajos y presentaciones referidos se citan a continuación:

- Bazzalo, M.E. 1981. Efecto de extractos de tallo de girasol sobre el crecimiento del hongo Sclerotinia sclerotiorum. XIV Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. Rosario, Pcia. Santa Fe.
- Bazzalo, M.E. 1982. Relación entre la edad de inoculación de Helianthus annuus, cultivado bajo condiciones controladas, y su susceptibilidad frente a Sclerotinia sclerotiorum. II Cong. Latinoam. de Fitopat. Tomo 1: 205-213. Bs. As.
- Bazzalo, M.E. 1982. Estudios preliminares para la identificación de sustancias inhibidoras en Helianthus annuus del crecimiento in vitro de Sclerotinia sclerotiorum. II Cong. Latinoam. de Fitopat. Tomo 1: 172-181. Bs. As.
- Bazzalo, M.E.; Heber, E. y O.H. Caso. 1983. Acumulación de compuestos fenólicos en plantas de girasol inoculadas con el hongo Sclerotinia sclerotiorum. XV Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. S.M. de Tucumán, Pcia. Tucumán.
- Bazzalo, M.E.; Heber, E. y O.H. Caso. 1983. Localización anatómica de compuestos fenólicos en plantas de girasol sanas e inoculadas con el hongo Sclerotinia sclerotiorum. XV Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. S.M. de Tucumán, Pcia. de Tucumán.
- Bazzalo, M.E.; Heber, E.; M.A. Del Pero de Martínez y O.H. Caso. 1985. Phenolic compounds in stems of sunflower plants inoculated with Sclerotinia sclerotiorum and their inhibitory effects on the fungus. Phytopathology Z., 112:322-332.
- Bazzalo, M.E.; Heber, E.; M.A. Del Pero de Martínez y O.H. Caso. Mecanismos de resistencia en Helianthus annuus frente a la podredumbre basal (Sclerotinia sclerotiorum). XI Conf. Int. de Girasol. Tomo II: 605-610. Mar del Plata, Pcia. de Bs. As.

INDICE

	<u>Pág.</u>
ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCION	
I.1. Problemática general	2
I.2. Objetivos	6
I.3. Antecedentes bibliográficos	
I.3.1. El hospedante	8
I.3.2. El patógeno	10
I.3.2.2. Taxonomía	10
I.3.2.2. Distribución geográfica	10
I.3.2.3. Especies vegetales que ataca	10
I.3.2.4. Morfología	12
I.3.2.5. Ciclo de vida	12
I.3.2.6. Fisiología	14
I.3.3. La interacción hospedante-patógeno	17
I.3.3.1. Aspectos conceptuales: parasitismo patogenismo	17
I.3.3.2. Hipótesis involucradas en las relaciones parasíticas y patogenísticas	18
I.3.3.3. La interacción <u>H. annuus</u> - <u>S. sclerotiorum</u>	24
I.3.3.3.1. Sintomatología	24
I.3.3.3.2. Impacto	24
I.3.3.3.3. Histopatología	25
I.3.3.3.4. Enzimas y toxinas fúngicas	26
I.3.3.3.5. Fisiología del desarrollo de la enfermedad	27
I.3.3.3.6. Virulencia y resistencia	29
I.3.3.3.7. Control	36
I.3.3.3.8. Predisposición	36
I.3.3.3.8.1. Efecto de la edad del hospedante en la predisposición	36
I.3.3.3.8.2. Efecto de los factores extrínsecos en la predisposición	37
I.3.4. Conclusiones	38

II. MATERIALES Y METODOS	<u>Pág.</u>
II.1. Materiales	40
II.1.1. Material vegetal	40
II.1.2. Material fúngico	40
II.1.3. Material de laboratorio	41
II.2. Métodos de laboratorio	41
II.2.1. Cultivo del hongo	41
II.2.2. Cultivo de las plantas	42
II.2.3. Métodos y zonas de inoculación	45
II.2.3.1. Métodos de inoculación	45
II.2.3.2. Zonas de inoculación	45
II.2.3. Edades de inoculación	46
II.2.4. Evaluación de la susceptibilidad	46
II.2.5. Métodos para el estudio de los distintos componentes de la defensa	50
II.2.5.1. Estado nutricional del hospedante	50
II.2.5.1.1. Contenido de azúcares solubles totales	50
II.2.5.1.2. Contenido de aminoácidos libres	50
II.2.5.1.3. Contenido de calcio	51
II.2.5.2. Mecanismos bioquímicos de defensa	51
II.2.5.2.1. Obtención de extractos vegetales	51
II.2.5.2.1.1. Extractos acuosos obtenidos en frío	51
II.2.5.2.1.2. Extracción con el sistema agua-metanol-cloroformo	51
II.2.5.2.1.3. Extractos metanólicos	52
II.2.5.2.2. Compuestos fenólicos	52
II.2.5.2.2.1. Extracción	52
II.2.5.2.2.2. Cuantificación	54
II.2.5.2.2.3. Estudios cualitativos	56
II.2.5.2.2.4. Localización anatómica	62
II.2.5.2.3. Bioensayos	65
II.2.5.3. Mecanismos histológicos de defensa	66

	<u>Pág.</u>
II.2.6. Análisis estadístico	67
 III: RESULTADOS, DISCUSION Y CONCLUSIONES PARCIALES	
III.1. Efecto de la edad del hospedante en la predisposición	68
III.1.1. Introducción	68
III.1.2. Método de inoculación	69
III.1.3. Zonas de inoculación	74
III.1.4. Efecto de la edad de <u>H. annuus</u> en su predisposición a <u>S. sclerotiorum</u>	77
III.1.4.1. Plantas cultivadas con 12 horas de luz	77
III.1.4.2. Plantas cultivadas con 16 horas de luz	83
III.2. Estudios preli inares para la detección de componentes de la defensa involucrados en cambios de tolerancia	
III.2.1. Introducción	96
III.2.2. Cambios en el contenido de nutrientes orgánicos	98
III.2.2.1. Cambio en el contenido de azúcares totales	98
III.2.2.2. Cambio en el contenido de aminoácidos libres	103
III.2.3. Cambios en la susceptibilidad a las enzimas fúngicas: contenido de calcio en los tejidos	106
III.2.4. Cambios en las barreras químicas	107
III.2.4.1. Estudios preliminares sobre el crecimiento in vitro	109
III.2.4.2. Mecanismos bioquímicos en plantas cultivadas en cámara bioclimática	112
III.2.4.2.1. Efecto de extractos acuosos obtenidos en frío	112
III.2.4.2.2. Efecto de extractos acuosos, etanólicos y clorofórmicos	117
III.2.4.3. Mecanismos bioquímicos en plantas cultivadas a campo	127
III.2.4.3.1. Efecto de extractos acuosos obtenidos en frío	127
III.2.4.3.2. Efecto de extractos acuosos, etanólicos y clorofórmicos	128
III.2.4.4. Conclusiones	130

	<u>Pág.</u>
III.3. Compuestos fenólicos en relación con los mecanismos bioquímicos de resistencia.	
III.3.1. Introducción	134
III.3.2. Determinación del tiempo de extracción de los fenoles solubles	136
III.3.3. Compuestos fenólicos totales	136
III.3.3.1. Estudios cuantitativos y relación entre la concentración de los fenoles en los extractos y su efecto sobre el crecimiento micelial	136
III.3.3.1.1. Plantas cultivadas en cámara bioclimática	139
III.3.3.1.1.1. Análisis al 5º día de la inoculación	139
III.3.3.1.1.2. Contenido fenólico en plantas de edad II a distintos tiempos después de la inoculación	148
III.3.3.1.2. Plantas cultivadas a campo	151
III.3.3.1.2.1. Grupos de individuos susceptibles y tolerantes de una única edad	151
III.3.3.1.2.2. Contenido de fenoles de acuerdo con la zona de inoculación	153
III.3.3.1.3. Conclusiones	153
III.3.3.2. Estudios cualitativos	158
III.3.3.2.1. Plantas cultivadas en cámara bioclimática	158
III.3.3.2.1.1. Análisis de extractos no hidrolizados	158
III.3.3.2.1.2. Análisis de extractos hidrolizados	163
III.3.3.2.2. Plantas cultivadas a campo	164
III.3.3.2.2.2. Análisis de extractos hidrolizados	169
III.3.3.2.3. Análisis cromatográficos de extractos no hidrolizados de <u>H. tuberosus</u>	169
III.3.3.2.4. Conclusiones	173
III.3.4. Compuestos fenólicos aislados de plantas cultivadas en cámara bioclimática	174
III.3.4.1. Estudio comparativo de las concentraciones en plantas sanas e inoculadas tolerantes y susceptibles	174
III.3.4.2. Efecto de los principales compuestos sobre el crecimiento micelial	182
III.3.4.3. Identificación de los principales compuestos fenólicos	188
III.3.4.3.1. Compuestos 1 y 2	188
III.3.4.3.2. Compuestos 3, 3' y 4	190

	<u>Pág.</u>
III.3.4.3.3. Compuestos 15 y 15'	193
III.3.4.3.4. Otros compuestos	194
III.3.4.4. Determinación de la concentración del ácido isoclorogénico que ocasiona una inhibición del 50% (CI 50)	197
III.3.4.5. Cuantificación del ác. isoclorogénico <u>in vivo</u>	200
III.3.4.5.1. Cálculo del factor de corrección para la expresión de la concentración sobre la base del peso de los tejidos que contienen fenoles	200
III.3.4.5.2. Valores corregidos y no corregidos	202
III.3.5. Efecto de los ácidos fenólicos libres sobre el crecimiento micelial, determinación de sus CI 50	204
III.3.6. Observaciones acerca de la oxidación de los medios de cultivo	212
III.3.7. Localización histoquímica de los fenoles en los tallos	215
III.4. Factores mecánicos en relación con la tolerancia	
III.4.1. Introducción	228
III.4.2. Tallo sano	229
III.4.2.1. Descripción anatómica	229
III.4.2.2. Proporción de los distintos tejidos en cada edad	230
III.4.2.3. Lignificación de los tejidos	233
III.4.3. Tallo enfermo	233
III.4.4. Conclusiones	234
IV. DISCUSION GENERAL	236
V. CONCLUSIONES FINALES	241
VI. RESUMEN	244
VII. BIBLIOGRAFIA	246

ABREVIATURAS

AM: agar extracto de malta
APG: agar papa glucosado
CM: crecimiento micelial
CI: concentración inhibitoria
IM: índice de marchitez
L: zona de lesión
SA: zona sana adyacente a la lesión
PN: zona sana por encima del primer nudo verdadero
C: tejido "cortical" (corteza, floema, parénquima interfascicular)
X: tejido xilemático
I: estadio vegetativo
II: estadio de botón floral cerrado
II_S: individuos susceptibles de estadio II
II_T: individuos tolerantes de estadio II
III: estadio de botón floral
IV: estadio de botón floral abierto
PAL: fenilalanina amonioliasa
PG: poligalacturonasa
PME: pectin metilestearasa
PPO: polifenoloxidasas
AC 2%: ácido acético al 2%
B:Ac:A: butanol-ácido acético-agua
B:Fo:A: butanol-ácido fórmico-agua
Be:Ac:A: benceno-ácido acético-agua
OHNa:Fo:A: hidróxido de sodio-ácido fórmico-agua
DPNA: p-nitroanilina diazotizada
FC: reactivo de Folin Ciocalteu

I. INTRODUCCION

1.1. Problemática general

La Patología Vegetal agrupa a todos aquellos aspectos de la actividad biológica y científica concernientes con la comprensión del complejo fenómeno que es la enfermedad en las plantas.

Bateman (1978) propone un concepto de la enfermedad en términos modernos: "la enfermedad es la alteración perniciososa de uno o más de los procesos ordenados de utilización de la energía, consecuente de la irritación continua producida por un factor o factores causales primarios". Esta definición es compatible con una idea muy difundida que sostiene que la enfermedad puede ser desencadenada o iniciada tanto por factores bióticos como abióticos, internos o externos al sistema. Además es aplicable a todo el espectro de sistemas de organización: ecosistemas, poblaciones, individuos, órganos, tejidos y células. La consideración de la energía y su utilización hacen que sea posible esta amplia aplicación.

La Fisiopatología Vegetal comprende aquellas especialidades dentro de la Fitopatología que se concentran en las actividades fisiológicas y bioquímicas de los patógenos y de la planta hospedante, considerados no solo como componentes individuales sino también como complejos en continua y dinámica interacción.

En el presente existe, por parte de la comunidad científica, un reconocimiento cada vez mayor de que solo a través de un conocimiento profundo y básico de todos los componentes interactuantes de la biota agrícola será posible aumentar la capacidad de alimentar a una población mundial en expansión. En este contexto, la Fisiopatología Vegetal ha asumido una nueva significación en el amplio campo de la Fitopatología. A pesar de ello son muy escasos los trabajos realizados en la Argentina en esa área.

Las poblaciones vegetales están expuestas a enfermedades en todos los estadios de sus ciclos de vida. Las presiones que estas ejercen sobre los sistemas pueden ser devastadoras y llevar directamente a la extinción local de las especies vegetales atacadas, o al debilitamiento de los individuos tornándolos más vulnerables a presiones subsecuentes. Por ejemplo la pérdida de la capacidad fotosintética debido a la enfermedad disminuye la resistencia al "stress" de los factores abióticos o a la infección por otros patógenos, y reduce la habilidad competitiva.

El estudio de las causas de las enfermedades no es un tema simple debido a que estas se ven afectadas y moduladas por factores tanto externos como internos al hospedante. Hasta hace poco tiempo ha existido una fuerte tendencia a focalizar el patógeno como la única causa de la enfermedad. Esto ha llevado a una limitación en el conocimiento de los mecanismos causales y ha restringido el tipo de análisis experimental esencial para la comprensión de la enfermedad como un fenómeno biológico. Actualmente los fitopatólogos utilizan el "triángulo de la enfermedad" y, más recientemente, la pirámide de la enfermedad (Fig. 1) para ayudar a visualizar el complejo de factores relacionados con ella (Browning et al., 1977). De este modo, una etiología integral deberá considerar los elementos que constituyen dicha pirámide: el hospedante, el patógeno, el ambiente y el tiempo. La comprensión de la causalidad, entonces, requerirá que los componentes de la misma sean separados y analizados conceptual y experimentalmente, y los factores determinantes reacomodados en términos de su ocurrencia espacial y temporal.

La resistencia al daño producido por agentes infecciosos es un carácter genético de alto valor adaptativo que confiere, al genotipo que lo posee, una mayor aptitud biológica. La resistencia se basa en la capacidad para mantener o crear un ambiente desfavorable para los agentes patógenos. Así, los mecanismos básicos de la resistencia involucran dos aspectos fundamentales: 1) la existencia de barreras físicas y químicas que impidan el ingreso del agente infeccioso al interior del huésped; 2) los mecanismos de respuesta que lleven a la inhibición de la invasión y a la eliminación de los patógenos dentro de la planta. Ambos pueden ser constitutivos en la planta

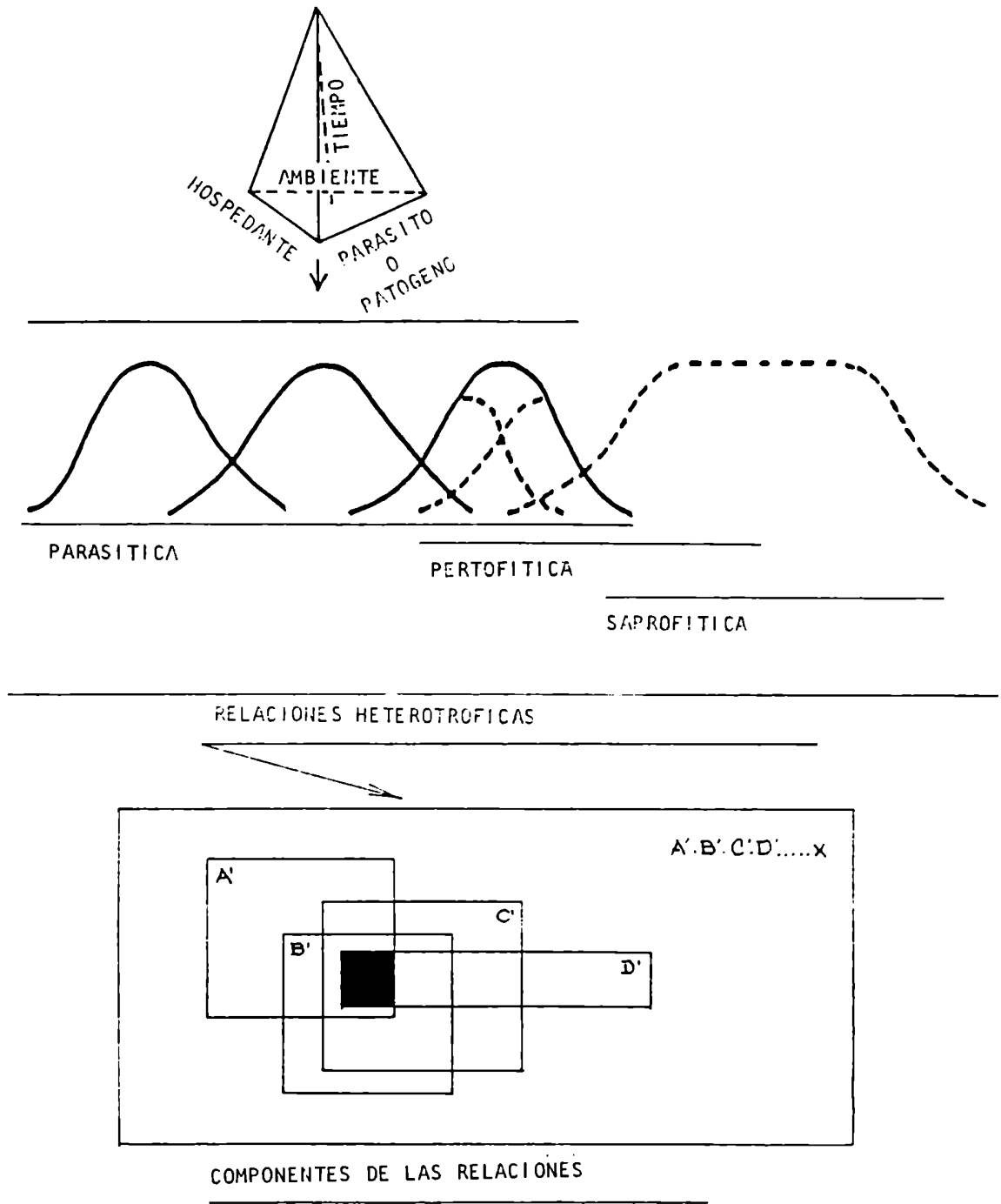


Figura 1: Esquema de relaciones heterotróficas (según Bateman, 1978). Los tipos de relaciones (A) mutualismo (B) comensalismo (C) patogenismo, y (D) saprofitismo se muestran en relación con los modos de existencia-parasítica, pertofítica o saprofítica. Del total de componentes (X) en una dada relación se han denominado A', B', C' y D' a aquellos que determinan que el tipo de relación sea un mutualismo, comensalismo, patogenismo o saprofitismo, respectivamente. Se considera que dichas relaciones son determinadas por los componentes de los elementos constituyentes de la pirámide: hospedante-parásito-ambiente-tiempo.

sana o adaptativos y desarrollarse como consecuencia de la infección.

El conocimiento de los mecanismos de resistencia en las plantas es fundamental para el control de sus enfermedades. El desarrollo de métodos microanalíticos para la cuantificación de sustancias antipatogénicas, involucradas en dichos mecanismos, pueden ser de gran utilidad como herramienta en programas de selección de la resistencia genética a enfermedades. Por otro lado, el conocimiento de estos mecanismos aporta las bases fisiológicas para dichos programas. Asimismo, el estudio de la estructura y modo de acción de estas sustancias contribuye a la búsqueda racional de compuestos sintéticos biológicamente activos (ya sea por su composición o acción análoga) útiles en Terapéutica Vegetal (Bell, 1981). Una vez conocidas las sustancias inhibidoras se plantea un nuevo interrogante que muy recientemente ha comenzado a dilucidarse. Esto se refiere al modo en que el patógeno induce o desencadena el desarrollo, por parte de la planta, de estos mecanismos de defensa. Cabe señalar que inoculando plantas susceptibles con hongos, bacterias o virus no virulentos o no patogénicos para esa especie se ha logrado la inmunización local y sistémica contra patógenos virulentos (Kuč, 1982). Esto se obtuvo a través de la inducción de la expresión de la información potencial de la planta. El conocimiento de los metabolitos que inducen estas respuestas facilitaría y haría más aplicable la inmunización vegetal.

Por último, pero no por ello menos importante, el estudio de los factores temporales y ambientales predisponentes a las enfermedades como moduladores de los mecanismos de defensa, sean estos histológicos, bioquímicos o fisiológicos, se hace indispensable para el adecuado control de las enfermedades parasitarias (Yarwood, 1959; Johnson y Klisiemicz, 1969). Además estos conocimientos son fundamentales para la búsqueda de materiales resistentes y la confección de modelos de predicción.

1.2. Objetivos

De los cultivos oleaginosos, el girasol es uno de los principales en la Argentina, ocupando nuestro país el segundo lugar como productor mundial. La esclerotiniosis del girasol, causada por el hongo Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary, es una de las enfermedades más importantes de este cultivo (Vrânceanu, 1977). Se presenta en dos formas: como podredumbre de la base del tallo, acompañada de marchitez total; y como pudrición total o parcial del capítulo.

Otros factores que agravan la situación son: la presencia del patógeno en todas las áreas girasoleras del país, la formación por parte del hongo de cuerpos de resistencia (esclerocios) que permanecen en el suelo y retienen su capacidad infectiva por 3-8 años, la gran polifagia del hongo lo que dificulta el control a través de la rotación del cultivo (Purdy, 1979), y el hecho de no contarse hasta el momento con la resistencia absoluta. Sin embargo, se ha observado la existencia de diferencias en la susceptibilidad frente a este patógeno entre los distintos cultivares e híbridos de girasol (Dueck et al., 1978). Así mismo, Auger y Nome (1970) encontraron que, a campo y en invernáculo, la susceptibilidad a la podredumbre basal varía con el momento del ciclo de vida en que la planta es inoculada con el hongo.

Todas estas evidencias permiten formular la hipótesis sobre la existencia de mecanismos de defensa en girasol determinados genéticamente, cuya expresión está influenciada por el estadio fenológico de la planta en el momento de la inoculación.

Sclerotinia sclerotiorum es un hongo extremadamente polífago (ataca 361 especies vegetales), que ha sido muy estudiado desde el punto de vista de su sistema enzimático, toxinas, condiciones de formación y germinación de esclerocios y ascosporas, e histopatología. Sin embargo no se conocen antecedentes previos a este trabajo sobre los mecanismos de defensa del girasol frente a este hongo, y se cuenta con escasa información sobre los mismos en otras especies vegetales atacadas por las distintas especies de Sclerotinia.

El objetivo principal de este trabajo de Tesis ha sido profundizar en el conocimiento de la interacción Helianthus annuus-Sclerotinia sclerotiorum, desde un punto de vista fisiopatológico. El mayor énfasis se ha centralizado en el estudio de los mecanismos de resistencia del girasol frente a ese hongo. Para ello se utilizó como sistema experimental, diversos estadios del ciclo de vida del hospedante que presentaron distintas respuestas de susceptibilidad frente al patógeno. Los estudios se desarrollaron, en cámara bioclimática. La investigación se llevó a cabo a través del desarrollo de tres líneas principales de trabajo. La primera tuvo como finalidad conocer el estado nutricional del huésped como predisponente a la enfermedad. Otra se orientó hacia la detección de mecanismos de defensa bioquímicos y la tercera se refirió al estudio de las barreras del tipo mecánico. En todos los casos los estudios se realizaron en plantas sanas y enfermas para averiguar si los mecanismos eran de tipo preinfeccional o se desarrollaban como consecuencia de la infección; y en las distintas zonas del tallo para conocer si los mecanismos eran de tipo local o sistémico.

Los resultados parciales obtenidos orientaron la investigación a profundizar en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos. Los esfuerzos se centralizaron en la dilucidación del rol de los compuestos fenólicos en la defensa. Para ello se llevó a cabo un estudio cuali y cuantitativo de estos compuestos y se determinó su efecto inhibitor sobre el crecimiento in vitro del patógeno. Adicionalmente, se los localizó anatómicamente en los tallos sanos y enfermos para poder interpretar su eventual rol in vivo.

A fin de conocer si los mecanismos hallados están presentes cuando se dan las condiciones de cultivo naturales, se realizaron estudios con plantas cultivadas en el campo.

Con el propósito de determinar el grado de especificidad de los mecanismos, se analizaron los componentes bioquímicos de defensa en una especie de girasol. Se trató de Helianthus tuberosus especie que es considerada tolerante a esta enfermedad.

1.3 . Antecedentes Bibliográficos

1.3 .1 El huésped: Helianthus annuus L.

Dentro de las diversas versiones sobre su origen cabría considerar que esta oleaginosa es oriunda del sudoeste de Estados Unidos y del norte de Méjico. Fue cultivada por los aztecas e incas e introducida en España y Francia a mediados del siglo XVI, pasando posteriormente a Rusia en el siglo XVIII (Vrânceanu, 1977).

El cultivo del girasol en la Argentina se lleva a cabo desde hace unos 150 años. Su semilla fue traída al país por los inmigrantes de Europa Oriental, quienes la sembraron para el consumo directo y para la alimentación de las aves. No obstante, a partir de 1930 este cultivo adquiere importancia. A pesar de las considerables oscilaciones anuales, tanto de superficies sembradas como en rendimiento o producción total, la Argentina figura siempre entre los primeros países productores.

Por otra parte, el girasol se encuentra entre los cuatro cultivos más utilizados en el mundo para la obtención de aceite comestible junto con la soja, el maní y la colza.

En la Argentina, desde hace más de 30 años se constituye en la fuente básica de la producción de aceite comestible destinado al consumo humano, al extremo de representar entre la mitad y los dos tercios del aceite total consumido.

El girasol pertenece al Orden Synandrales, Familia Compositae Adans., SubFamilia Tubuliflorae DC., Tribu Helianthae Cass., Género Helianthus L.

Heiser (1969) agrupa las 68 especies del género Helianthus en 4 secciones: Annuus, Divaricati, Ciliares y Fruticosi.

La posibilidad que posee H. annuus de hibridarse fácilmente ha permitido la producción de híbridos artificiales con diversas especies perennes. Entre ellas se encuentra H. tuberosus que es un hexaploide perteneciente a la sección Divaricati y que exhibe una tolerancia natural a S. sclerotiorum (Orellana, 1975). En tal sentido se la ha utilizado en estudios tendientes a obtener híbridos interespecíficos resistentes al mencionado patógeno (Orellana, op. cit.).

H. annuus es una especie anual, con vigoroso desarrollo de todos sus órganos. Tanto el tallo como la raíz poseen crecimiento primario y secundario (Carter, 1978).

El sistema radical alcanza su máximo crecimiento en floración. Normalmente la longitud de la raíz principal sobrepasa la altura del tallo. Este último es erecto, vigoroso, cilíndrico y macizo. Su superficie externa es rugosa y vellosa; sin embargo la vellocidad decrece o está ausente en la zona basal.

La ontogénesis del girasol ha constituido el objetivo de numerosos estudios. Según Semihnenko (en Vrânceanu, 1977), las fases de desarrollo de una variedad de girasol semitardía son las siguientes:

<u>Fase</u>	<u>Comienzo y fin de la fase</u>	<u>Duración(días)</u>
1. Germinación y emergencia de semillas	-Desde la siembra hasta la aparición de los cotiledones	10-30
2. Formación de hojas	-Desde la emergencia a 4-5 pares de hojas verdaderas	20-24
3. Diferenciación de los primordios del receptáculo	-De 4-5 pares de hojas hasta 7-8 pares.	8-10
4. Crecimiento activo	-De 7-8 pares hasta floración	26-28
5. Floración	-Principio a fin de la misma	14-16
6. Formación de semillas y acumulación del aceite	-Desde el fin de la floración hasta el color amarillo-verdoso de los capítulos	20-25
7. Llenado de las semillas y consecución de su tamaño definitivo	-Del color amarillo-verdoso de los capítulos hasta el color amarillo-oscuro	15-20

1.3.2. El patógeno: *Sclerotinia sclerotiorum*

1.3.2.1. Taxonomía

El agente causal de la podredumbre basal y del capítulo del girasol es *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, hongo que se caracteriza por su gran agresividad y polifagia. Pertenece a la Clase Ascomycetes, SubClase Euascomycetes, Serie Discomycetes, Orden Helotiales, Familia Sclerotiniaceae (Kohn, 1979; Zimmer y Hoes, 1978).

1.3.2.2. Distribución geográfica

Su distribución es mundial, localizándose en zonas templadas, tropicales y subtropicales (Zimmer y Hoes, 1978; Purdy, 1979).

1.3.2.3. Especies vegetales que ataca

Es uno de los patógenos inespecíficos. Ataca 64 familias, 225 géneros y 361 especies vegetales (Purdy, op.cit.) (Tabla 1).

En la Argentina Sarasola (1942) lo considera un patógeno importante para el girasol (*Helianthus annuus*), causante de la podredumbre basal. Luciano y Davreaux (1967) lo citan como causante de la podredumbre del capítulo. Marchionatto (1948) lo cita sobre repollo (*Brassica oleracea* var. capitata); Feldman y Pontis (1960) lo aislaron de apio (*Apium graveolens*) y lo citan en el alelí (*Matthiola incana*), caléndula (*Calendula officinalis*), dalia (*Dahlia* sp.), zanahoria (*Daucus carota*), haba (*Vicia faba*), lechuga (*Lactuca sativa*), maní (*Arachis hypogea*), papa (*Solanum tuberosum*), poroto (*Phaseolus vulgaris*), pimiento (*Capsicum annuum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*). Campi (1941) lo determinó en arvejillas (*Lathyrus odoratus*) y *Gloxinia* sp.; Muntañola (1955) en arveja (*Pisum sativum*); Carranza (1973) lo aisló del clavel (*Dianthus caryophyllus*); Mitidieri (1973) de batata (*Ipomoea batata*), coliflor (*Brassica oleracea* var. botrytis), frutilla (*Fragaria vesca*) y lenteja (*Lens culinaris*); Pontis y Klingner de perejil (*Petroselinum crispum*); Castello (1969) lo cita sobre soja (*Glycine*) y Carranza (1975) sobre albahaca (*Ocimum basilicum*). También ataca *Citrus*, especialmente limonero, produciendo la llamada "gomosis esclerotiniosa".

Tabla 1: Familias y números de géneros y especies que se citan como hospedantes de S. sclerotiorum (Purdy, 1979).

Familia	Género N°	Especie N°	Familia	Género N°	Especie N°	Familia	Género N°	Especie N°
Actiniaceae	1	1	Aizoaceae	1	1	Amaranthaceae	2	3
Anonaceae	2	2	Apocynaceae	1	2	Araliaceae	2	2
Aristolochiaceae	2	2	Asclepiadaceae	2	2	Begoniaceae	1	1
Berberidaceae	1	1	Boraginaceae	4	8	Campanulaceae	2	4
Capparidaceae	1	1	Caryophyllaceae	3	3	Chenopodiaceae	3	3
Compositae	39	62	Convolvulaceae	1	1	Cruciferae	18	32
Cucurbitaceae	3	6	Dipsacaceae	2	3	Euphorbiaceae	2	4
Fagaceae	1	1	Fumariaceae	1	1	Gentianaceae	1	1
Geraniaceae	1	2	Gesneriaceae	1	1	Gramineae	7	7
Hippocastanaceae	1	1	Iridaceae	3	4	Labiatae	4	4
Lauraceae	1	1	Leguminosae	21	52	Liliaceae	5	8
Linaceae	1	2	Malvaceae	5	9	Martyniaceae	1	1
Moraceae	2	4	Musaceae	1	2	Myoporaceae	1	1
Myrtaceae	1	1	Oleaceae	2	4	Onagraceae	2	2
Orobanchaceae	1	2	Papavraceae	3	4	Passifloraceae	1	1
Pinaceae	4	4	Plantaginaceae	1	1	Polemoniaceae	1	2
Plygonaceae	3	3	Portulacaceae	1	1	Ranunculaceae	7	14
Rosaceae	7	14	Rutaceae	1	8	Saxifragaceae	1	1
Scrophulariaceae	6	6	Solanaceae	10	19	Theaceae	1	1
Tiliaceae	1	1	Tropaeolaceae	1	2	Umbelliferae	13	14
Urticaceae	3	5	Valerianaceae	1	1	Violaceae	1	1
Vitaceae	1	1	Misc. (no clasif.)	1	2			

1.3.2.4. Morfología

El micelio está constituido por hifas muy ramificadas y tabicadas. Puede desarrollarse tanto en la superficie como en el interior de los órganos atacados (Poliakov, 1968). También produce microconidios que surgen como ramificaciones cortas y laterales desde el micelio o de los extremos de hifas normales (Sarasola y Sarasola, 1975).

Los esclerocios, cuerpos de resistencia, están constituidos por una corteza de hifas de paredes melanizadas, oscuras y muy engrosadas; y una médula parenquimatosa laxa (Lamarque, 1976) de elementos globosos (Kohn, 1979).

Cuando las condiciones ambientales son óptimas para la germinación de los esclerocios estos producen sobre su superficie estípites, o micelio vegetativo. Los estípites llevan en su extremo a los apotecios (cuerpos fructíferos) dentro de los cuales se ubican los ascos con ascosporas (esporas de origen sexual).

Cuando las ascosporas, micelio o esclerocios son ubicados sobre un medio de cultivo sólido, las hifas crecen sobre su superficie formando una película delgada. Cuando la colonia alcanza el borde del recipiente, o cuando el crecimiento se ve restringido, la mata micelial se engrosa y da origen a esclerocios. Los esclerocios por lo general se disponen en una serie de círculos concéntricos o algún otro patrón regular (Le Torneau, 1979).

Las hifas vegetativas contienen varias organelas y un único septo perforado simple.

1.3.2.5. Ciclo de vida

Consta de una fase asexual y una sexual que tienen como nexo de unión a los esclerocios. Estos permanecen en el suelo, o en los restos de cosecha (Figura 2).

Cuando las condiciones ambientales son favorables, el esclerocio germina produciendo micelio (germinación miceliogénica). Este micelio necesita invadir materia orgánica muerta, para poder luego infectar a la planta huésped (Purdy, 1958). Así se da comienzo a la fase asexual del ciclo de vida.

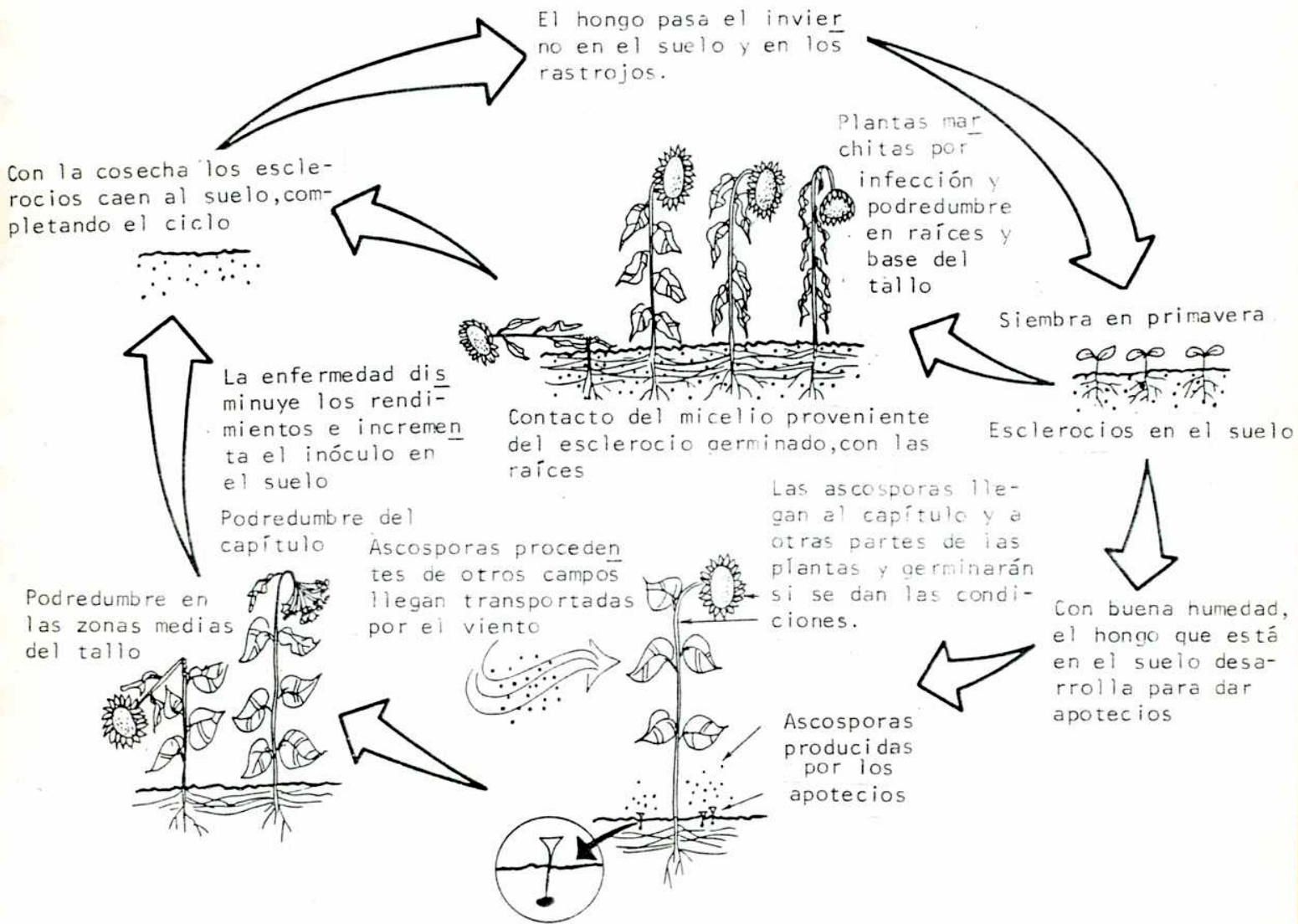


Figura 2: Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*, y las enfermedades que provoca en girasol (esquema extraído de Cooperative Extension Service, North Dakota State University. Ext. 1984) (B. Nelson y H.A. Lemey).

La penetración tiene lugar a través de las raíces o por la base del tallo (Dueck y Campbell, 1978; Huang, 1978; Carter, 1978). Esta germinación puede ocurrir durante todas las fases del crecimiento del girasol causando podredumbre de raíces y de la base del tallo, y severa marchitez foliar. Cuando las condiciones son favorables y la enfermedad prospera se desarrolla externamente sobre la planta enferma, e internamente en la médula y entre los diversos tejidos del tallo un micelio blanco algodonoso y abundante. Subsecuentemente se forman esclerocios los que reiniciarán el ciclo al incorporarse al suelo con la caída del órgano enfermo, o en los restos de cosecha.

En otras condiciones el esclerocio produce de 1 a 8 estípites (germinación carpogénica) portando cada uno 1 apotecio. Aquí se inicia la fase sexual del ciclo de vida. Una vez maduras las ascosporas son liberadas y transportadas por el viento hasta la superficie del capítulo y, en ocasiones, del tallo en su parte media. Como consecuencia se produce la pudrición parcial o total del órgano atacado. El ciclo se cierra con la formación de nuevos esclerocios sobre la superficie o en el interior de los órganos atacados.

1.3.2.6. Fisiología

a) Formación y composición de los esclerocios (Le Tourneau, 1979).

Los resultados de determinaciones químicas y análisis histoquímicos demuestran diferencias en la composición de los esclerocios formados in vitro respecto a la de aquellos coleccionados a campo. En estos últimos, obtenidos del poroto y la arveja, las grasas constituyeron menos del 2%, las cenizas entre el 3,5 y 5% y las proteínas del 20-25% del peso seco. Una considerable proporción fue soluble en metanol (20-25%). En contraste con esto, los esclerocios crecidos sobre medio sintético poseyeron una menor proporción de grasas, material soluble en metanol y proteínas.

Los carbohidratos constituyen la mayor proporción del esclerocio maduro, un 25% de estos se halla en forma de β -glucano. Métodos histoquímicos demostraron la presencia de los polisacáridos, quitina y glicógeno. Los principales carbohidratos de bajo peso molecular son la trehalosa y el manitol.

Generalmente también se detectan monosacáridos como glucosa o fructosa. La presencia de otros azúcares depende de la fuente carbonada del medio.

La formación de los esclerocios comienza con la anastomosis de largas hifas primarias que constituyen montículos de micelio blanco. Cuando el hongo es cultivado en un medio líquido (pH 6-7), el pH del filtrado del cultivo cae a 3-4 y luego tiende a incrementarse levemente. Esta disminución coincide con el momento de máxima producción de ácidos orgánicos y de la alta actividad de las enzimas del Ciclo de Krebs. La iniciación del esclerocio tiende a coincidir con la caída del pH. En caso de medio de cultivo sólido, la formación de esclerocios se relaciona con cambios en la disponibilidad de los nutrientes.

La supresión de la glicólisis y del Ciclo de Krebs, y la estimulación del ciclo de las pentosas fosfato se relacionan con la compactación y maduración de los esclerocios.

Se han detectado enzimas de la oxidación de fenoles en los esclerocios; y esto sugiere su relación con la formación de la corteza coloreada de dichas estructuras.

b) Factores que afectan la formación de los esclerocios y el crecimiento micelial in vitro (Le Torneau, 1979).

Factores nutricionales:

Fuentes carbonadas: Sclerotinia sp utiliza diversos compuestos orgánicos para su crecimiento micelial (CM) y formación de esclerocios. La trehalosa, azúcares-alcoholes y ácidos orgánicos producidos por el hongo y presentes en él son fuentes pobres de carbono. La mezcla de dos fuentes pobres sería más eficiente para el crecimiento que igual cantidad de una única fuente. La incapacidad para utilizar fuentes de carbono endógeno normalmente presentes en el esclerocio para el crecimiento micelial, podría ser parte de un mecanismo de control relacionado con la germinación miceliogénica y carpogénica.

Fuentes nitrogenadas: utiliza compuestos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo aminoácidos relacionados con los ácidos orgánicos del ciclo de Krebs.

La relación C/N y las formas de N en relación con la misma pueden también afectar la formación de los esclerocios.

Macronutrientes inorgánicos: la formación de los esclerocios solo se produce en medios con P, K, Mg y S, y se aumenta con la adición de mezclas de micronutrientes inorgánicos (Purdy y Grogan, 1954).

Factores no nutricionales:

Luz: Marukawa et al. (en Le Torneau, 1979) encontraron que la luz reduce el número y peso seco total de esclerocios. Por otro lado se encontró que la luz U.V. y azul son más efectivas que las demás longitudes de onda en promover el número de esclerocios.

Temperatura: este patógeno crece y produce esclerocios dentro de un amplio rango de temperaturas que va de 0 a 30°C, con un óptimo entre los 20 y 25°C.

pH: el hongo crece y produce esclerocios en medios con pH inicial de 2,9 a 9. El pH del medio de cultivo disminuye durante el ciclo de crecimiento, debido a la producción por parte del hongo de ácidos orgánicos.

c) Factores que afectan la supervivencia de los esclerocios en el suelo (Adams y Ayers, 1979).

El principal factor es el biológico. Más de 30 especies de hongos y bacterias son antagonistas de Sclerotinia sp in vitro: Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Coniothyrium, etc. Huang y Hoes (1976) han realizado estudios con el fin de utilizar a Coniothyrium en planes de control biológico de esta enfermedad.

d) Factores que afectan la germinación e infección por esclerocios

En presencia de materia orgánica muerta, el esclerocio germina dando un micelio infectivo (Purdy, 1958). Otro factor importante para la infección es la cercanía del esclerocio al hospedante. El micelio crece poco en el suelo, en suelo estéril la extensión del micelio no excede nunca los 30 mm, y en suelo no estéril el crecimiento es menor de 5 mm (Williams y Western, 1965).

e) Factores que afectan la germinación e infección ascospórica.

Abawi y Grogan (1979) han determinado que son necesarias de 48 a 72 hs de humedad continua sobre la superficie del hospedante para que la germinación ascospórica tenga lugar. Purdy (1958) determinó que es necesaria la presencia de nutrientes externos para que se produzca la infección.

1.3.3. La interacción huésped-patógeno

1.3.3.1. Aspectos conceptuales: parasitismo y patogenismo

Según Bateman (1978), el término parasitismo se refiere a "la relación o asociación entre organismos, generalmente provenientes de especies diferentes en la cual una parte, el parásito, se beneficia de la otra, el huésped". Es incorrecta entonces la idea de que la relación parasítica es necesariamente perjudicial. El parasitismo y la enfermedad son de hecho fenómenos biológicos diferentes.

La lucha por la existencia entre los organismos vivos lleva a dos tipos principales de relaciones nutricionales heterotróficas: la predación y el parasitismo. Dentro de este último tipo Bateman (op.cit.) incluye diferentes modalidades en las cuales la interacción huésped-parásito resulta en un mutuo beneficio de los asociados (mutualística); aquellas en las cuales solo uno de los asociados, generalmente el parásito, se beneficia sin efectuar daño al otro componente (comensalística); o relaciones en las cuales el hospedante o ambos asociados se dañan o mueren (patogenística).

Es importante tener en claro que no todos los parásitos son patógenos y viceversa. Los patógenos pueden ser de naturaleza biótica o abiótica.

El saprofitismo, incluye a aquellos individuos que colonizan y obtienen su alimento de organismos muertos. Por último, el perfitismo se refiere a un tipo intermedio de relación nutricional en la que el patógeno mata las células del hospedante antes de que ellas sean colonizadas (Figura 1). Este enfoque resulta novedoso ya que enriquece la comprensión del parasitismo en cuanto a las formas que puede adquirir según el balance final de la interacción. Sin embargo el empleo de términos ya utilizados para definir

relaciones diferentes del parasitismo (comensalismo, mutualismo), puede dificultar la comprensión.

1.3.3.2. Hipótesis involucradas en las relaciones parasíticas y patogénicas.

No es muy amplio el cuerpo conceptual del que dispone la Fitopatología. Actualmente se ha adquirido conciencia de la necesidad de contar con una estructura teórica que guíe o delinee las futuras investigaciones en este campo. En tal sentido Bateman (1978) realizó una revisión de las hipótesis principales que intentan explicar el establecimiento de las relaciones parasíticas y patogenísticas. Estos conceptos han ido evolucionando a lo largo del tiempo, a medida que nuevos conocimientos aportaron aspectos diferentes de estas complejas interacciones.

a. Hipótesis nutricional del parasitismo

"La hipótesis nutricional del parasitismo considera que un parásito crece en un hospedante particular, debido a que este le ofrece la cantidad y calidad de alimentos necesarios para su vida. En hospedantes resistentes los mencionados factores no se presentan o son insuficientes. Los distintos balances nutricionales, sumados a la capacidad del parásito para responder diferencialmente frente a los mismo explican los grados de resistencia y susceptibilidad, no explicables en otros términos" (en Lewis, 1953).

Bateman (op.cit.) considera que esta hipótesis contempla aspectos razonables pero que es incompleta desde un variado número de perspectivas, siendo la primera la comprobación. Las razones a las que alude son: a) la dificultad aparente de determinar la compleja nutrición de algunos parásitos; b) la falta de correlación entre parasitismo y complejidad nutricional; c) la similitud de los requerimientos nutricionales in vitro de algunos parásitos que presentan rangos de hospedantes muy diferentes; d) la idea de que el análisis del huésped no proveerá una verdadera visión de los nutrientes disponibles para el patógeno y e) el conocimiento de mecanismos activos de defensa tanto en animales como en plantas.

Sin embargo existen ejemplos como el aportado por Boone (1971) al estudiar mutantes nutricionales de Venturia inaequalis patógeno que produce

la sarna del manzano, en los cuales esta hipótesis explica en gran medida la interacción hospedante-patógeno.

b. La hipótesis del balance en parasitismo

Lewis (1953) enunció la siguiente hipótesis: "Entre los metabolitos del hospedante disponibles para un parásito potencial existen sustancias que pueden favorecerlo y otras que pueden impedir su crecimiento. Esas sustancias son vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc. Son metabolitos comunes a muchas especies diferentes. El tipo y concentración de los mismos varían en la planta con el cambio en las condiciones ambientales. Esa variación en sustancias capaces de alterar el crecimiento del parásito pueden explicar los cambios en resistencia y susceptibilidad que a veces ocurren dentro de un mismo hospedante. Las variaciones en concentración y tipos de metabolitos entre los distintos hospedantes, sumado a las diferentes respuestas de los distintos patógenos pueden explicar el complejo de patrones de resistencia y susceptibilidad. La inmunidad innata está determinada por la presencia de metabolitos normales del huésped, desfavorables para el crecimiento del parásito, o la ausencia parcial o completa de sustancias esenciales para dicho organismo, o por la combinación de ambas. La inmunidad de este tipo no está determinada por mecanismos especiales. Los metabolitos del hospedante susceptible favorecen el crecimiento del parásito. Existe, finalmente, un balance entre las sustancias que inhiben y las que promueven dicho crecimiento. Este balance podrá inclinarse hacia la resistencia por un lado, hacia la susceptibilidad por el otro, o permanecer entre ambos extremos".

La hipótesis formulada busca explicar el parasitismo selectivo y/o resistencia del hospedante sin tener en cuenta a sus mecanismos de defensa. Sin embargo, esta formulación parece proveer vías para la comprensión de problemas de parasitismo obligado y susceptibilidad varietal y específica en complejos en los cuales está involucrado un muy delicado balance entre los dos organismos interactuantes. Luego de un muy cuidadoso análisis debe concluirse-dice Bateman (op. cit.) que los principales fundamentos de esta hipótesis no son demostrables de un modo definitivo, a pesar de cuan evidentes sean los conceptos generales.

c. Hipótesis de la nutrición-inhibición en la patogenicidad

Garber (1956) formuló esta hipótesis que comprende elementos de la hipótesis del balance, pero agrega un componente significativo que es el concepto de la defensa por parte del hospedante.

"La hipótesis de la nutrición-inhibición involucra dos ambientes dentro del huésped los que afectan directamente el destino del invasor: un ambiente nutricional y un ambiente inhibidor.

Si el ambiente nutricional es inadecuado, el parásito no podrá ni proliferar ni metabolizar extensamente los tejidos y, por lo tanto, no será virulento. Si, por el contrario, el ambiente nutricional es adecuado el parásito poseerá esas capacidades pero aún podrá no ser virulento. Un ambiente inhibidor efectivo puede también estar o no presente. En ausencia del mismo, un parásito con un ambiente nutricional adecuado generalmente será virulento. En su presencia no lo será aún cuando el ambiente nutricional le sea favorable. En conclusión, de las 4 combinaciones posibles entre los mencionados ambientes, solo cuando la nutrición sea adecuada y la inhibición inefectiva resultará la virulencia y en las otras, la avirulencia".

Bateman (op. cit.) considera que esta hipótesis aún no contempla la totalidad del problema, ya que las características toxigénicas, antigénicas, morfológicas, y enzimáticas de los parásitos complican los esfuerzos por comprender las relaciones patogénicas en términos de ambientes nutricionales en la planta. Sin embargo reconoce que las tres hipótesis propuestas representan esfuerzos significativos tendientes a aumentar la comprensión, organizar el actual conocimiento, y aportar a la formulación de más vías adecuadas de investigación. En tal sentido este autor ofrece la hipótesis de los componentes múltiples que se presentará a continuación.

d. Hipótesis de los componentes múltiples para la patogenicidad y el parasitismo (Bateman, 1978).

La patogenicidad, la susceptibilidad, la resistencia y la patogénesis son todos procesos o atributos gobernados por las características genéticas de los sistemas vivientes, el ambiente físico en el cual ellos operan, y el tiempo. Esta hipótesis centra la atención sobre la naturaleza de los

componentes interactuantes como factores determinantes de las relaciones parasíticas o patogénicas. Se afirma sobre la consideración de la naturaleza compleja y dinámica de la vida, la existencia de barreras tanto físicas como químicas en los sistemas vivos, y el principio de que tanto el parásito como el hospedante contienen ciertos factores que son potencialmente favorables y otros potencialmente desfavorables.

Los principales conceptos que comprende esta hipótesis son los siguientes:

d.1. La naturaleza multicompuesta de la vida

Todos los procesos biológicos están sujetos a regulación a través de factores que los estimulan o inhiben. En la mayoría de los casos los controles son múltiples y es esto lo que les provee la enorme flexibilidad que poseen. La velocidad con que se desarrolla un determinado proceso biológico está influida por componentes múltiples, y es la suma de todos aquellos promotores e inhibidores la que la determina.

d.2. Barreras físicas o fisiológicas en los sistemas hospedante-parásito.

El establecimiento de las relaciones hospedante-parásito involucra el traspasar dos tipos de barreras. Las barreras físicas separan al hospedante del parásito evitando el contacto íntimo, o la colonización de la planta por este. Los parásitos pueden penetrarlas pasivamente a través de heridas o aberturas naturales, o poseer un medio activo de penetración. Ciertos parásitos son patogénicos solo dentro del hospedante, ya que son capaces de superar las barreras físicas.

Una vez superadas estas barreras físicas, el éxito o fracaso del parásito potencial depende de que este supere las barreras fisiológicas del hospedante potencial. Los múltiples factores, provenientes de ambos organismos, determinan la forma en la cual una barrera determinada será o no superada. Estos factores están regulados por los potenciales genéticos de ambos organismos, sujetos a distintos grados de expresión de acuerdo con el ambiente físico particular y a las modificaciones que surjan de la interacción de los distintos componentes.

d.3. El concepto del ambiente del hospedante y del parásito

Un parásito y un hospedante potenciales pueden ofrecerse mutuamente dos tipos de ambientes: favorable y desfavorable. Un ambiente determinado está compuesto de numerosos y diversos componentes algunos morfológicos y otros bioquímicos. En consecuencia es posible postular que existen 4 combinaciones potenciales en un complejo hospedante-parásito dado. Si este complejo es mutualístico predominan los ambientes favorables. Si la relación es comensalística, el ambiente favorable ofrecido por uno de los miembros favorece al otro, en tanto que los ambientes desfavorables de los dos y el favorable del otro miembro no son suficientemente operativos como para ser significativos. Cuando la relación es patogenística el ambiente desfavorable de uno o ambos miembros predomina. Si lo hace el ambiente ofrecido por el hospedante, este será resistente. De lo contrario será susceptible.

Esta hipótesis pretende proveer una estructura teórica que contenga las múltiples facetas de las interacciones hospedante-parásito, sea cual fuere el tipo de relación involucrada. En la Figura 3 se presentan gráficamente los principales elementos de la misma.

En la mayoría de las interacciones los 4 ambientes potenciales son operativos. De esta forma es el balance de los mismos incluyendo sus interacciones, los que determinarán el éxito o fracaso del parasitismo así como el tipo de asociación.

En una relación patogenística, el ambiente desfavorable del patógeno estará constituido por sus toxinas, enzimas, exceso de producción de reguladores de crecimiento, etc. El ambiente favorable del patógeno podrá estar dado por su capacidad de liberar glicósidos del hospedante a sus formas tóxicas y la capacidad de inducir las defensas activas de la planta. El ambiente favorable del hospedante incluirá la disponibilidad de nutrientes, pH adecuado, y otros factores necesarios para el crecimiento y reproducción del patógeno. Finalmente, el ambiente desfavorable del hospedante podrá incluir barreras físicas, compuestos antibióticos preinfeccionales y fitoalexinas.

Ciertos componentes de un ambiente determinado pueden ser constitutivos y otros inductivos. En el caso de los inductivos (fitoalexinas, enzimas adaptativas del patógeno), el componente en cuestión es inducido luego del intercambio de mensajes químicos entre los organismos interactuantes. En

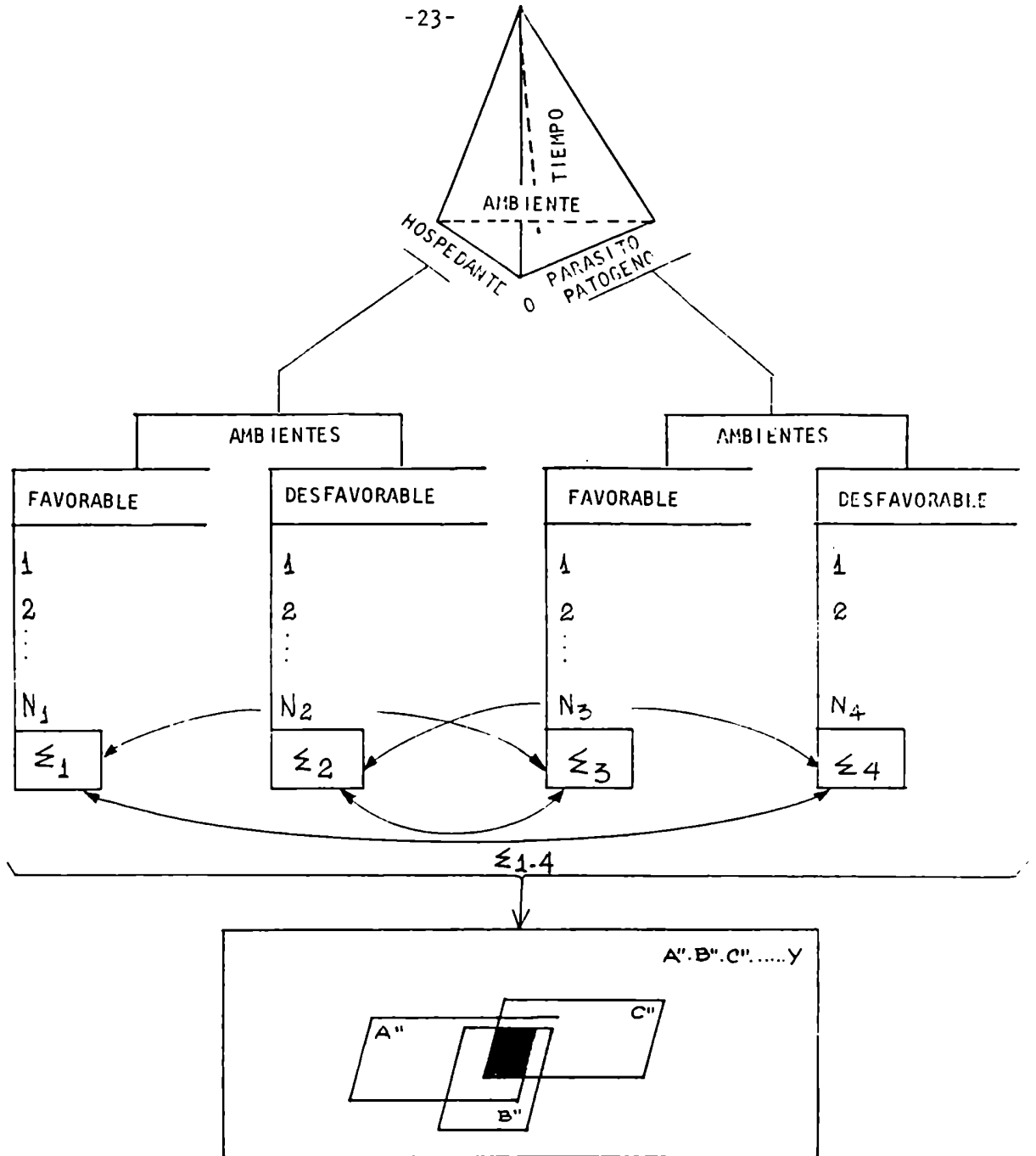


Figura 3: "Hipótesis de los componentes múltiples" (Bateman, 1978). Las relaciones parasíticas y patogénicas resultan de la sumatoria e interacción de los múltiples componentes que constituyen los ambientes "favorable" y "desfavorable", que ambos organismos interactuantes se ofrecen mutuamente. Del total de componentes Y se ha designado como A'', B'' y C'' a aquellos que determinan que la relación sea un mutualismo, comensalismo a patogenismo, respectivamente.

algunos casos, el ambiente favorable del hospedante es creado, al menos en parte, por componentes del ambiente desfavorable del patógeno. Es decir, que los distintos ambientes se afectan y modulan entre sí. Generalmente, la diferencia entre susceptibilidad y resistencia dentro de una misma especie vegetal no reside en diferencias cualitativas en el ambiente desfavorable del hospedante sino en la velocidad o intensidad de reacción del mismo.

1.3.3.3. La interacción H. annuus-S. sclerotiorum

1.3.3.3.1. Sintomatología

Podredumbre basal: esta enfermedad surge aisladamente al comienzo, luego en grupos de dos o más plantas y se extiende en forma de manchones o por hileras ya que el contagio se produce por contacto de raíces.

Se forma primero una lesión de color castaño claro, con ligera exudación, que se va extendiendo. La longitud de las lesiones puede variar de unos pocos a más de 50 cm; esto depende de la susceptibilidad del hospedante, condiciones ambientales y la virulencia del patógeno. Si la planta es tolerante puede no marchitarse. En caso de podredumbre avanzada, se produce una severa y total marchitez foliar. El tallo se seca y desfibra, la médula queda totalmente hueca y la planta se vuelca.

Podredumbre del capítulo: el hongo ataca la zona de inserción del capítulo con el tallo y este puede desprenderse y caer al suelo como consecuencia de la pérdida de resistencia de los tejidos. En la parte inferior del órgano atacado aparecen al principio manchas descoloridas, después de color castaño, que crecen y se extienden hacia el margen. Los tejidos pierden su turgencia, se vuelven flácidos, y toman una consistencia gelatinosa.

1.3.3.3.2. Impacto

De acuerdo con los informes obtenidos, las pérdidas atribuibles a S. sclerotiorum constituyen del 0 al 100% de la producción (Purdy, 1979). De las numerosas conversaciones mantenidas con los Ings. Agrs. F. Nome; E. Teyssandier; V. Pereyra y otros profesionales, es posible concluir que las podredumbres basal y del capítulo son enfermedades de importancia en la Argentina.

Sin embargo no existen relevamientos sistemáticos acerca de las pérdidas que este patógeno provoca en nuestro país.

La podredumbre basal sería de incidencia anual en Argentina pero produciría menores pérdidas en la cosecha que la podredumbre del capítulo. Sin embargo esta última enfermedad se daría con menos frecuencia, debido a que la condición de tan alta humedad requerida para la infección carpogénica no se dá muy comúnmente en las áreas girasoleras.

El ataque a la base del tallo sería más grave en la región girasolera que comprende a las provincias de Córdoba, San Luis y parte de La Pampa, en la cual el girasol se siembra a continuación de la soja, quien es también hospedante de S. sclerotiorum. Esto incrementaría el inóculo en el suelo.

La podredumbre del capítulo es potencialmente importante en la zona Sur. de Bs. As. siendo un problema potencialmente grave en especial para las siembras tardías (Pereyra comunicación personal).

1.3.3.3.3. Histopatología

La información acerca de este tema ha sido recopilada por Lumsden (1979).

Penetración

La capacidad y el modo de penetración del patógeno a los tejidos vegetales dependen del tipo de inóculo, del estado de nutrición del hongo, de las propiedades del huésped y de los factores del ambiente.

El micelio que surge a partir de esclerocios germinantes, penetra a través de la cutícula o de heridas en raíces o base del tallo.

El micelio en contacto con la planta produce apresorios que generalmente son estructuras complejas, mucilaginosas, en forma de copa. La penetración, según algunas teorías, puede ser solo mecánica o una combinación de acción química y mecánica.

Primeros estadios de la infección

Apenas producida la penetración, el hongo forma una vesícula granular, inflada, entre la cutícula y la epidermis. Esta dará origen a las "hifas de infección", anchas y granuladas que invaden los tejidos en forma radial principalmente intercelular. La región subcuticular parece ofrecer una menor resistencia a la invasión, por lo cual esta es más rápida hacia abajo y arriba que hacia el interior del órgano atacado. Las hifas de infección son las responsables de la destrucción de las defensas del hospedante, de la colonización inicial de los tejidos, y de los cambios que en ellos se producen. Dichos cambios son la alteración y destrucción de los materiales pécticos de las laminillas medias de las células (al parecer esta acción se produce con anterioridad al arribo de las hifas de avance), muerte celular, copiosa acumulación de agua en los márgenes de infección y cambios en la permeabilidad celular.

Ultimos estadios de la infección

Luego de la colonización de los tejidos (12-24 hs después de la penetración) se desarrollan ramas hifales de pequeño diámetro, muy ramificadas, que invaden los tejidos muertos intra e intercelularmente. Estas hifas penetran las paredes celulares y son responsables de la destrucción de sus estructuras cristalinas. Dichas hifas invaden también los vasos y regiones interfasciculares y taponan el tejido vascular conjuntamente con cristales de oxalato de Ca. Esto es una de las causas del marchitamiento foliar (Pawloski y Hawn, 1964).

Luego de una extensa colonización de los tejidos, las hifas ramificadas emergen a la superficie del hospedante y dan origen a esclerocios en las lesiones maduras.

1.3.3.3.4. Enzimas y toxinas fúngicas

Enzimas

Hancock (1966) determinó actividad de pectinmetilesterasa (PME) y endo y exo poligalacturonasas (PG) en tejidos de girasol y tomate infectados con

S. sclerotiorum. Dichas enzimas se relacionan con la disminución de las sustancias pécticas en las laminillas medias. La PME posee la función de demetilar la pectina, la endoPG hidroliza al azar al ácido poligalacturónico en diversas fracciones y la exoPG lleva a continuación estos productos a unidades de ácido galactourónico. El pH óptimo de estas enzimas fúngicas es 4,5-5. Se las detectó muy tempranamente en los márgenes de avance de las lesiones.

Hancock (1967) y Lumsden (1969) estudiaron las enzimas celulasas y hemielulasas en girasol y poroto respectivamente. Dichos investigadores encontraron que S. sclerotiorum posee un sistema completo de celulasas capaz de utilizar celulosa nativa como fuente de energía. También se detectó en tejidos enfermos de girasol la actividad de las enzimas arabanasas, galactanasas y xilanasas.

Lumsden (1970) estudió las fosfatidasas del patógeno producidas tanto en cultivo como en poroto infectado. Poseerían la función de degradar los fosfátidos de las membranas celulares. Son enzimas adaptativas, extracelulares y activadas por Ca; su pH óptimo es 4.

Finalmente también se cita la producción de enzimas proteolíticas en medios de cultivo y tejidos enfermos (Lumsden, 1979).

Toxinas

S. sclerotiorum produce ácido oxálico el cual actúa como una toxina móvil de distribución sistémica.

1.3.3.3.5. Fisiología del desarrollo de la enfermedad.

Colonización

Las enzimas PME y endoPG actúan conjuntamente; lisan las laminillas medidas lo que permite el crecimiento intercelular del patógeno.

Nutrición durante la patogénesis

Las celulasas, hemicelulasas, exoPG, fosfatidasas y enzimas proteolíticas tendrían una función nutricional. Su acción sobre la pared y el contenido celular proveería al patógeno de fuentes carbonadas y nitrogenadas. Las celulasas y hemicelulasas actúan tardíamente en el proceso de la patogénesis. Estarían relacionadas con el crecimiento intracelular de las hifas muy ramificadas que se originan de las hifas de infección, detrás de los extremos de las hifas de avance.

Cambios en la permeabilidad celular

Thatcher (1939) encontró, en pecíolos cortados de Apium graveolens infectado por S. sclerotiorum, un aumento de la permeabilidad en los tejidos adyacentes a las lesiones. Sugirió que dichos cambios permitirían la nutrición del hongo durante el período inicial de la infección, previo a la hidrólisis de paredes y muerte celular, y serían responsables del tipo de podredumbre acuosa.

Por el contrario, Hancock (1972) demostró la disminución de la permeabilidad en tejidos adyacentes a lesiones en tallos intactos de girasol infectados. Este autor considera que los resultados obtenidos por el primero se deben más al efecto de senescencia de los tejidos cortados que al de la enfermedad.

Efectos del ácido oxálico

En estadios tempranos el ácido oxálico actúa sinérgicamente con las enzimas pectinolíticas. Este efecto se da a través de su fuerte acción como quelante de Ca y otros cationes. Se liga a estos sustrayéndolos de los pectatos y permite de esta forma la acción de las PG (Maxwell y Lumsden, 1970; Bateman y Beer, 1965). También tendría la función de disminuir el pH de los tejidos atacados, y favorecer de esta manera la acción de las enzimas fúngicas. Este cambio drástico de pH, acompañado de la quelación de cationes y destrucción de sustancias pécticas sería el causante de la muerte celular. Además, el ácido oxálico actuaría como una toxina móvil de distribución

sistémica. Se acumularía en el follaje siendo responsable de la marchitez foliar (Noyes y Hancock, 1980). El taponamiento de los vasos por cristales de oxalato contribuiría en la producción de dicho efecto.

Muy recientemente Marciano et al. (1983) encontraron que esta toxina exhibe una acción inhibitoria de las polifenoloxidasas del hospedante a pH 4.

1.3.3.3.6. Virulencia y resistencia

1. Virulencia

Los datos con los que se cuenta son contradictorios. Algunos trabajos (Held, 1955; Lumsden, 1976; Khare y Bompeix, 1976) demuestran una correlación positiva entre algunas enzimas (endoPG y proteasas) y metabolitos tóxicos, y la virulencia de ciertos aislamientos de Sclerotinia. Por el contrario, ciertos autores encuentran ausencia de correlación con la virulencia de fosfatidasas, protopectinasas, PME y PG (Lumsden, 1970; Newton, 1972). Marciano et al. (1983) no hallaron relación positiva entre las enzimas degradadoras de la pared celular (PG, celulasas y lignanasas) y la virulencia, entre sí entre la magnitud de la producción del ácido oxálico y la misma.

2. Resistencia

2a. Conceptos y mecanismos generales

De acuerdo con la hipótesis de los componentes múltiples formulada por Bateman (1978), el huésped ofrece un ambiente "desfavorable" al patógeno potencial el cual incluye los diversos tipos de mecanismos de defensa.

Estos mecanismos comprenden tanto barreras físicas como químicas y fisiológicas. Estas a su vez pueden ser clasificadas como barreras a la penetración y al desarrollo según el nivel al cual actúan. Cuando el mecanismo es operativo antes de la infección se lo denomina pasivo, preinfeccional o constitutivo. De lo contrario es activo, postinfeccional o inducido (Horsfall y Dimond, 1959). Una categoría intermedia podría considerarse como semiconstitutiva (Ingham, 1973).

2a.1. Barreras a la penetración

Royle (1976), Campbell et al. (1980) y Bell (1981) ofrecen recopilaciones sobre las investigaciones realizadas en este campo.

Las defensas a la penetración involucran dos estrategias básicas: 1) mantener a los invasores potenciales fuera del área de ataque y 2) presentar barreras protectoras en caso de que el invasor acceda a la superficie del hospedante.

Dentro de el primer tipo pueden incluirse la presencia de pelos o tricomas, o la producción de olores desagradables que mantengan alejados a los insectos vectores de fitopatógenos. Asimismo, la cutícula, al ser una superficie hidrofóbica evita la acumulación de agua adquiriendo características no apropiadas para la fijación y germinación de ciertos patógenos.

El segundo tipo de estrategias incluye las características de la cutícula que la hacen impenetrable o difícil de degradar como grosor, dureza, composición química y presencia de inhibidores. De igual modo, la presencia, número y localización de espinas, pelos, estomas, lenticelas, etc están relacionados con una mayor o menor facilidad en la penetración. La calidad y grosor de las paredes de la epi y peridermis también pueden estar involucradas en este tipo de defensa.

2a. 2. Barreras al desarrollo

2a.2.1. Barreras preformadas

2a.2.1.1. Barreras físicas

Una vez que el patógeno ha penetrado en el interior del hospedante puede encontrar barreras físicas preformadas que impidan su penetración más allá de las capas superficiales y limiten su diseminación.

Este tema ha recibido poca atención y los trabajos con los que se cuenta son escasos y antiguos. Esto se debe al concepto del factor único en la resistencia. El hecho indudable que estas barreras por si solas no explican la resistencia que ha llevado a su subestimación. Por el contrario, pueden constituir elementos complementarios importantes, que actúen conjuntamente con las barreras químicas preinfeccionales, permitiendo al hospedante desarrollar a tiempo sus defensas postinfeccionales.

Las principales características que pueden estar relacionadas con este tipo de mecanismos son: la abundancia y distribución de elementos lignificados y suberificados; el grado de lignificación y suberificación de los mismos; y la proporción de pectatos de Ca insolubles en la laminilla media y pared celular (Akai y Fukutomi, 1980).

2a.2.1.2. Barreras químicas

Entre las barreras químicas preinfeccionales el factor más generalizado consiste en la presencia de compuestos tóxicos. Estos incluyen a saponinas, lactonas no saturadas, aceites, glicósidos fenólicos y cianogénicos, aminoácidos, alcaloides, polienos, poliacetilenos, estilbenos, terpenos, etc. (Schönbeck y Schlösser, 1976; Overeem, 1976).

Los antibióticos constitutivos pueden estar completamente sintetizados (en su forma activa) y almacenados en vacuolas, glándulas lisígenas, conductos, duramen y peridermis. Se encuentran en concentraciones apropiadas para producir efectos tóxicos y solo requieren ser liberados de sus reservorios para entrar en contacto con el patógeno (preinhibidores). Otro tipo de antibiótico constitutivo es aquél que se encuentra en forma de precursor menos tóxico y se almacena en vacuolas. El antibiótico final se forma rápidamente por la acción de oxidasas o/y hidrolasas localizadas en otras partes de las células (inhibidores). Un tercer tipo de antibiótico es aquel que se encuentra en forma activa pero en baja concentración en la planta sana. Debe sufrir una acumulación postinfeccional para alcanzar los umbrales inhibitorios (postinhibidores). A este último tipo se lo clasifica como barrera semiconstitutivas (Ingham, 1973).

Las células vegetales producen enzimas hidrolíticas las que se almacenan en vacuolas o esferosomas. En el curso de la patogénesis, la alteración de las estructuras de membrana lleva a su liberación hacia el interior de las células y espacios intercelulares. Esto puede contribuir a la creación de un "ambiente desfavorable" para el patógeno. La lisis hifal se ha atribuido a la presencia de quitinasas y 1-3 glucanasas producidas por el hospedante (Bell, 1981).

La ausencia de factores primarios de "reconocimiento" entre los organismos, que permiten el establecimiento de la interacción; o de receptores de

toxinas específicas pueden relacionarse con la resistencia/susceptibilidad en algunas interacciones (Schlösser, 1980).

2a.2.2. Barreras postinfeccionales

2a.2.2.1. Barreras físicas (Beckman, 1980; Bell, 1981).

Dentro de este tipo de barreras se pueden citar: la acumulación de calcio en pared y laminilla media; la síntesis y deposición de nuevo material de pared; la aposición de carbohidratos; la formación de papilas, tilosis y geles vasculares; la lignificación, etc.

2a.2.2.2. Barreras químicas

Las revisiones realizadas por Cruickshank (1963, 1980), Kuć (1972, 1976) y Bell (1981) aportan una información muy completa sobre las barreras químicas postinfeccionales.

Este tipo de barrera comprende a las fitoalexinas. Algunos autores también incluyen a compuestos preinfeccionales que se acumulan como consecuencia de la infección (Ingham, 1973).

Muller et al. (en Cruickshank, 1963) formularon en 1941 la Teoría de las Fitoalexinas basada en sus estudios con papa y diversas razas fisiológicas de Phytophthora infestans. Dichos compuestos postinfeccionales deberían cumplir con los siguientes postulados:

- a) "El principio que inhibe el desarrollo fúngico en un tejido hipersensible, denominado fitoalexina, es formado o activado solo cuando las células del hospedante toman contacto con el parásito".
- b) "La acción de defensa solo ocurre en células vivas".
- c) "El material inhibidor es una sustancia química que puede considerarse como un producto de la necrobiosis celular".
- d) "La fitoalexina no es específica en su toxicidad hacia los hongos, sin embargo las especies fúngicas pueden ser diferencialmente sensibles a la misma".

- e) "La respuesta básica que ocurre en hospedantes susceptibles y tolerantes es similar. La base de la diferenciación es la velocidad de síntesis de las fitoalexinas".
- f) "La reacción de defensa está confinada al tejido colonizado y a su inmediata vecindad".
- g) "El estado de resistencia no es heredable. Se desarrolla después de la penetración fúngica. La sensibilidad de la célula del hospedante, que determina la velocidad de la reacción, es específica y está genotípicamente determinada".

Müller et al. (op. cit.) no lograron demostrar la existencia de una sustancia discreta que poseyera las características teóricas por ellos propuestas. Fue luego de 20 años cuando Cruickshank y Perrin (1960) fueron capaces de aislar e identificar la primera fitoalexina que se denominó pisatina, la cual provenía de Pisum sativum infectado con Sclerotinia fructicola. Desde entonces se han descrito un gran número de fitoalexinas. Su naturaleza es casi completamente específica para cada familia por lo que poseen interés taxonómico adicional. Incluyen gran variedad de productos: isoflavonoides, flavonoides, dehidrofenantrenos, estilbenos, cumarinas, isocumarinas, terpenoides, furanoacetilenos, poliacetilenos y polienos. Para la familia Compositae, las fitoalexinas descritas provienen del grupo de los poliacetilenos (derivados de ácidos grasos). Thomas y Allen (1970) estudiaron las fitoalexinas producidas por Carthamus tinctorius en respuesta a la infección de Phytophthora drechsleri (podredumbre de la base del hipocótilo).

Las fitoalexinas también son inducidas por factores abióticos tales como la luz U.V., shocks térmicos, heridas y tratamientos con sales inorgánicas. Esto hace pensar que dichos compuestos forman parte de un mecanismo general de reparación y defensa, ya que pueden ser inducidos por una amplia gama de agentes.

En cuanto a la relación estructural entre los diversos tipos de fitoalexinas, no es posible vislumbrar relaciones claras entre sus estructuras y fungitoxicidad. La única propiedad general que poseen es un cierto grado de solubilidad lipídica. Esta propiedad sería un requerimiento necesario para su toxicidad si la sustancia poseyera la función de interferir, atacar, o bloquear la permeabilidad de las membranas fúngicas.

Patógenos necrotróficos tanto virulentos como avirulentos y saprófitos son capaces de metabolizar las fitoalexinas en una variedad de formas. En algunos casos el producto es tan o más tóxico que el anterior, y en otros ocurre lo contrario. De esta forma, la susceptibilidad podría relacionarse con una menor velocidad de síntesis por el hospedante, o por una mayor capacidad de detoxificación por parte del patógeno.

Con respecto a los mecanismos de inducción de las fitoalexinas por parte de los patógenos, se han aislado glucanos, proteínas y glicoproteínas microbianas con capacidad inductiva.

Existen numerosas hipótesis tendientes a explicar el rol de estos inductores a nivel molecular (Cruickshank, 1980). Dentro de ellas se destaca la "inducción mutua" postulada por Metlitskii (en Cruickshank, 1980) para la interacción papa-Phytophthora infestans. Este investigador propone que la reacción de la enfermedad está determinada por cuatro factores: un metabolito de la planta que interactúa con un receptor específico localizado sobre la membrana del parásito, causando la secreción de un inductor de fitoalexinas quien penetra a las células del huésped estimulando la síntesis de fitoalexinas.

Cruickshank (1980) postula: 1) los metabolitos de la planta, en gotas de infección y durante el curso de la misma, afectan tanto cuali como cuantitativamente los inductores secretados durante la germinación esporal e infección y 2) los inductores desencadenan y regulan la biosíntesis de fitoalexinas ya sea, via síntesis de novo de enzimas por la activación de enzimas existentes en la planta. Esta "hipótesis de inducción doble" se representa gráficamente en la Figura 4. Debe enfatizarse que se trata de procesos metabólicos en los cuales están involucrados numerosos pasos. Cada uno puede estar sujeto a controles secundarios, diferentes a los pasos primarios de control, y podrán influir en la acumulación neta de fitoalexinas durante el curso de la infección.

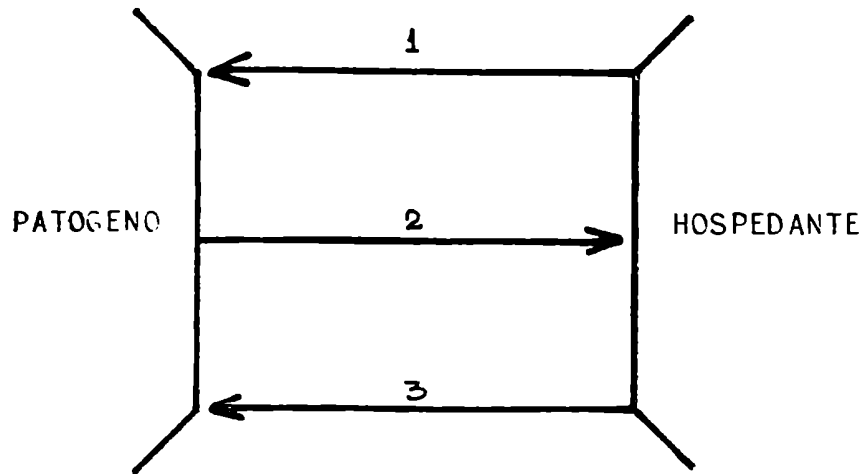


Figura 4: Hipótesis de la inducción doble (Cruickshank, 1980). Para que la inducción de los mecanismos de defensa se produzca, es necesaria la interacción del hospedante y del patógeno. Metabolitos producidos por la planta durante el curso de la infección (1), afectan cuali y cuantitativamente a los inductores secretados por el patógeno (2). Dichos inductores desencadenan y regulan la síntesis de fitoalexinas, por parte del hospedante (3).

2b. Mecanismos de defensa en interacciones que involucran la acción patogénica de diversas especies de Sclerotinia.

Lumsden (1979) revisó la escasa información existente sobre este tema para las distintas especies de Sclerotinia, en diversos hospedantes. Concluye que existirían tres tipos generales de mecanismos: 1) Anatómicos (resistencia del tejido a la degradación); 2) Compuestos antifúngicos preformados y 3) compuestos antifúngicos postinfeccionales.

1.3.3.3.7 Control

Los métodos empleados son de naturaleza química y manejo del cultivo; sin embargo no existen resultados totalmente eficientes (Steadman, 1979; Zimmer y Hoes, 1978). Se trabaja actualmente en el desarrollo del control biológico (Huang y Hoes, 1976; Huang, 1978) y la búsqueda de resistencia genética (Putt, 1958; Le Clerq, 1973; Huang y Dorrel, 1978; Thompson et al., 1978), pero sin resultados satisfactorios.

1.3.3.3.8 Predisposición

La predisposición puede ser definida como la tendencia de condiciones no genéticas (extrínsecas e intrínsecas) que actúan antes de la infección y afectan la susceptibilidad de las plantas a las enfermedades (Yarwood, 1959).

1.3.3.3.8.1. Efecto de la edad del hospedante en su predisposición al patógeno

Con respecto a la predisposición ontogénica es importante distinguir entre la edad de la planta entera y la del órgano atacado.

Yarwood (op. cit.) reconoce cuatro patrones básicos de la variación de la susceptibilidad a lo largo del ciclo de vida del hospedante:

- 1) Susceptibilidad juvenil y resistencia adulta
- 2) Resistencia juvenil y susceptibilidad adulta
- 3) Susceptibilidad en la juventud y adultez, y resistencia en el período intermedio.
- 4) Resistencia juvenil y adulta con susceptibilidad en el período intermedio

Bell (1980) en su reciente revisión sobre el tema considera los mismos patrones básicos que Yarwood (op.cit.) pero confiriéndoles un mayor dinamismo:

- 1) La defensa se incrementa al aumentar la edad de la planta o del órgano.
- 2) Las defensas disminuyen con la edad del hospedante
- 3) La defensa es cíclica a lo largo del transcurso de vida del hospedante

Son escasos los trabajos sobre la predisposición ontogénica de los diversos hospedantes frente a Sclerotinia sp. Wade (1955), estudió la pudrición de frutos producida por S. fructicola en duraznero y observó que este hongo puede penetrar el fruto cuando aún está verde. Permanece en estado de latencia hasta que el fruto madura y se hace apto para el crecimiento fúngico. Fajardo (1965) consideró prematuro extraer conclusiones sobre la susceptibilidad de la lechuga, en los distintos estadios de desarrollo, al ataque de Sclerotinia. Según Putt (1958) y Pawloski y Hawn (1964), los girasoles en el campo son más susceptibles a S. sclerotiorum en el estadio de floración que en el de plántula. Auger y Nome (1970) realizaron, a campo y en invernáculo, una curva de susceptibilidad del girasol de acuerdo con la edad en que era inoculado con S. sclerotiorum; encontraron dos momentos de máxima susceptibilidad: botón floral y flor fecundada.

1.3.3.3.8.2. Efecto de los factores extrínsecos en la predisposición

Yarwood, en sus dos revisiones sobre este tema (1959 y 1976) destaca la importancia de los diversos factores extrínsecos sobre la predisposición a las enfermedades parasitarias. Los principales factores son: temperatura, humedad, luz, presión atmosférica, nutrición mineral y pH. Otros

aspectos no menos importantes tienen que ver con el manejo de los cultivos por parte del hombre: densidad y profundidad de la siembra, poda, labores culturales, etc. Finalmente se destacan también el efecto de enfermedades previas, infección por nemátodos y daños o heridas producidas por frío o calor.

Un incremento en la fertilización nitrogenada aumenta la susceptibilidad del girasol a la podredumbre basal (Heber et al., 1985). Lo mismo ocurre al aumentar la densidad de siembra (Hoes, 1975), y al disminuir el fotoperíodo (Orellana, 1975).

1.3.4. Conclusiones

El estado actual del conocimiento acerca de las diversas enfermedades producidas por Sclerotinia sp. ofrece una idea bastante completa sobre distintas etapas de la patogénesis, y aporta una visión general respecto a los mecanismos ofensivos del patógeno.

Sin embargo es muy escasa la información disponible acerca de los mecanismos de defensa de los distintos huéspedes frente a las especies de este género, careciéndose de antecedentes previos en el caso del girasol.

Las distintas hipótesis acerca de los factores que afectan el establecimiento de las interacciones huésped-patógeno (1.3.3.2.) resultaron provechosas para orientar los pasos preliminares de este trabajo. Esto condujo a abordar el problema desde distintas líneas de investigación y permitió contar con un panorama general de la influencia de la edad (III.1) y el estado nutricional del huésped (III.2.2. y III.2.3) sobre la predisposición a la podredumbre basal, así como sobre la presencia de mecanismos de defensa bioquímicos (III.2.4.) y anatómicos (III.4.) pre y post-infeccionales.

Como resultado de todas las evidencias obtenidas a partir de este estudio integrado del tema se estimó de interés profundizar en los aspectos bioquímicos, por haber sido considerados los de mayor relevancia (III.3.).

Los sucesivos avances en el conocimiento de este sistema llevaron a la reafirmación del criterio actual sobre la multiplicidad y dinamismo de los factores determinantes de la tolerancia/susceptibilidad en las plantas. Es por eso que en el capítulo V se presentan esquemas hipotéticos integradores de los diversos mecanismos que se proponen.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1 Materiales

II.1.1. Material Vegetal

Los ensayos preliminares realizados con el objeto de conocer las mejores condiciones de cultivo de las plantas y de poner a punto diversas metodologías se realizaron con el híbrido comercial de girasol (Helianthus annuus L.) de ciclo largo Super 500 de Cargill. Luego, se decidió continuar el trabajo con la línea isogénica N°33107 de la mencionada firma. Esta decisión obedeció al hecho de que al realizar los estudios en cámara bioclimática -con el consecuente bajo número de individuos disponibles por ensayo- fue necesario disminuir la variabilidad genotípica del material empleado.

Para corroborar si los mecanismos de defensa encontrados en las plantas cultivadas en condiciones ambientales controladas eran similares a los presentes en plantas cultivadas a campo, se estudió también material de poblaciones de girasol que estaban siendo mejoradas por selección recurrente para resistencia a esta enfermedad por Cargill, en su campo experimental de Pergamino.

A fines comparativos se realizaron algunos estudios con Helianthus tuberosus, especie silvestre aparentemente tolerante a esta enfermedad. El material vegetal empleado se mencionará en cada caso.

II.1.2. Material fúngico

En todos los ensayos se utilizó la cepa altamente virulenta de Sclerotinia sclerotiorum N°16, mantenida en el Centro de Ecofisiología Vegetal. Dicha cepa fue aislada por E. Teyssandier, de la firma antedicha. El hongo fue repicado regularmente y se mantuvo sobre granos de arroz húmedo, previamente esterilizados.

11.1.3. Material de laboratorio

Para los análisis el material vegetal fue homogeneizado en un homogeneizador Sorval. Todos los estudios analíticos se llevaron a cabo por cromatografía, ya sea sobre papel Whatman N°3 MM (46 x 57 cm) o en placas delgadas de celulosa Schleider and Schüll. Todos los cromatogramas fueron corridos en cubas de vidrio y se observaron una vez secos, bajo luz U.V. de longitud de onda larga, empleando una lámpara Gallenkamp. Los espectros de las sustancias aisladas fueron leídos en un espectrofotómetro Beckman M 36.

En todos los casos se utilizaron drogas pro-análisis.

Los estudios de microscopia de fluorescencia se realizaron en un microscopio Zeiss (lámpara de mercurio HB200, G365-FT395 LP420).

11.2. Métodos

11.2.1. Cultivo del hongo

a) Medios de cultivo para ensayos de crecimiento in vitro del patógeno.

El medio de cultivo ensayado fue agar extracto de malta en distintas concentraciones (AM) (Nobles, 1948).

Para su preparación las cantidades necesarias de extracto de malta (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 gr) se disolvieron en 100 ml de agua destilada agregando luego 2,0 gr de agar en polvo. Para cada tratamiento se prepararon 8 cajas de Petri con 20 ml de medio de cultivo, previamente esterilizado en autoclave, a 100°C y 1 atmósfera de presión durante 20'.

Las cajas eran inoculadas en forma estéril, con el patógeno que había crecido durante 7 días sobre medio agar papa glucosado (APG). Luego se las incubó a 24°C, durante 10 días.

Se efectuaron mediciones diarias de los radios de las colonias hasta el 7° día después de la inoculación. Se determinó también el número y peso seco de los esclerocios formados al 10° día.

b) Medio de cultivo para los ensayos biológicos

Se emplearon dos tipos de medios: agar-extracto de malta al 0,1% y medio mineral definido de Hancock (1966). La composición de este último medio se describe en la Tabla II.

11.2.2. Cultivo de las plantas

Los aquenios de girasol se ubicaron en cajas germinadoras que contenían una capa de algodón cubierta por papel de filtro humedecido con agua desmineralizada. Dichas cajas se colocaron en cámaras incubadoras a 26°C. Una vez germinadas, las plantitas se transfirieron a macetas pequeñas y ubicaron en la cámara bioclimática bajo las condiciones de cultivo standard que se determinarán más abajo. A la semana de crecimiento se seleccionó a las plántulas más vigorosas y homogéneas para su trasplante definitivo a macetas plásticas de un litro de capacidad que contenían tierra adicionada con turba en una proporción 1:1 (vol./vol.).

Las condiciones de cultivo de las plantas fueron:

- Termoperíodo: 22 ± 2°C durante el día y 20 ± 2°C durante la noche.
- Humedad Relativa: 73-85%.
- Fotoperíodo: se utilizaron dos: 12 hs luz/12 hs oscuridad, y 16 hs luz/8 hs oscuridad.
- Radiación fotosintéticamente activa (400 a 700 nm): 900 $\mu\text{E.m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ al nivel de las hojas superiores.
- Fuentes de luz: la cámara estuvo provista de 5 lámparas HPLN de 400 W y 4 incandescentes de 75 W.
- Riego: las plantas se regaron diariamente con agua desmineralizada y dos veces por semana con solución nutritiva de Hoagland(Tab.III).
- Rotación: las plantas fueron cambiadas de posición dentro de la cámara diariamente a fin de evitar eventuales efectos de gradientes ambientales que pudieran existir dentro de la misma.

Con el objeto de comparar los resultados parciales obtenidos con las plantas crecidas en cámara bioclimática con otros provenientes de plantas cultivadas bajo condiciones naturales, se realizaron estudios similares con estas últimas plantas a fin de detectar similitudes o diferencias entre los distintos mecanismos de defensa encontrados. Se analizaron individuos

Tabla II: Medio mineral definido (Hancock, 1966).

Agua destilada	1000 ml
KH_2PO_4	1,36 gr
Na_2CO_3	1,06 gr
MgSO_4	0,50 gr
Pectina	5,00 gr
Asparagina	1,00 gr

El pH de los medios fue ajustado a 5,6 con HCl o NaOH 0,1 N.

Tabla III: Medio nutritivo de Hoagland.

	Sol. madre (gr/l de agua dest.)	Solución final (ml/l de agua dest.)
-KH ₂ PO ₄	136,00	1
-KNO ₃	101,10	5
-(NH ₄) ₂ HPO ₄	115,04	1
-Ca (NO ₃) ₂	164,10	5
-Mg SO ₄	120,39	2
<u>-Micronutrientes;</u>		1
H ₃ BO ₃	2,86	
Mn Cl ₂ ·4H ₂ O	1,81	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08	
-FeEDTA		5
Na EDTA	7,45	
SO ₄ Fe·7H ₂ O	5,57	

inoculados experimentalmente, cultivadas en el campo experimental de la empresa Cargill, que estaban siendo mejorados por E. Teyssandier para resistencia a S. sclerotiorum en las campañas: 80-81; 81-82 y 83-84 y del mismo material sembrado en Orán (Salta) en el invierno de 1981.

11.2.3. Métodos y zonas de inoculación

11.2.3.1. Métodos de inoculación

- i) Se colocaron 10 gr de arroz y 10 ml de agua desmineralizada en erlenmeyers de 125 ml. Luego de esterilizarlos en autoclave a una atmósfera de presión, durante 25 minutos, se los inoculó con un disco de 5 mm de diámetro de medio AM 1% infectado con S. sclerotiorum. El inóculo se ubicó en el centro de la capa de arroz. El hongo había crecido previamente sobre el medio de inoculación durante 7 días a 26°C. Luego de igual período de incubación el arroz infectado se depositó sobre una caja de Petri y homogeneizó. Cada tallo de girasol fue inoculado ubicando un grano de arroz sobre la base de cada epicótilo, al nivel de la superficie del suelo. El inóculo se mantuvo unido al tallo con una bandita de PVC, que además tuvo la función de evitar su desecación. Los tallos testigo fueron inoculados de igual modo con granos de arroz estériles.
- ii) Se obtuvo un gran número de esclerocios de plantas de girasol infectadas artificialmente a campo con la cepa utilizada en este trabajo. Se seleccionó un número adecuado, de tamaño homogéneo. Los esclerocios fueron esterilizados superficialmente durante 1 minuto con hipoclorito de sodio (5%). Se ubicó un esclerocio en la base del epicótilo de cada tallo, a la altura de la superficie del suelo. El inóculo se mantuvo unido al tallo por medio de una película delgada de PVC.

11.2.3.2. Zonas de inoculación

En los ensayos realizados bajo condiciones controladas se inoculó siempre en la base del epicótilo, sobre la superficie del suelo. En condiciones de campo se comparó la inoculación en el epicótilo e hipocótilo en un híbrido

comercial (Super 400, Cargill) y una línea (madre del mencionado híbrido). En ambos casos se evaluó la susceptibilidad al ser inoculados con el patógeno. El ensayo fue diseñado y llevado a cabo por E. Teyssandier en el campo experimental de la firma Cargill, en Pergamino, y evaluado en nuestro laboratorio. Las plantas fueron inoculadas en la primera semana de floración (estadio de máxima susceptibilidad). Para cada material vegetal y zona se inocularon 20 plantas. Los parámetros evaluados fueron: longitud de las lesiones, color de las mismas y estado del tallo (hueco o firme).

11.2.3. Edades de inoculación

En la Tabla IV se describen las características de los estadios estudiados.

11.2.4. Evaluación de la susceptibilidad

Según lo expresa Populer (1978), un mayor grado de susceptibilidad a una determinada enfermedad fúngica puede manifestarse a través de uno o más de los cuatro componentes de susceptibilidad que se mencionan a continuación:

- 1) Un mayor número de infecciones resultantes de una determinada cantidad de inóculo. Por ejemplo mayor número de manchas foliares.
- 2) Lesiones más grandes o que se agrandan más rápidamente.
- 3) Períodos de latencia más cortos. Por ejemplo menor tiempo desde la infección hasta la esporulación.
- 4) Una mayor producción de esporas por unidad de tejido o lesión.

Con respecto a la podredumbre basal en particular, otros autores utilizan, en general, un índice de severidad de marchitez expresado del siguiente modo:

$$I.M. = \frac{\Sigma (\text{grado de intensidad}) \times (\text{N}^\circ \text{de plantas infectadas por grado})}{\text{N}^\circ \text{total de plantas inoculadas}}$$

Así, Orellana (1975) establece 5 grados, desde 0: plantas sin síntomas a 5: plantas muertas. Por el contrario Marciano *et al.* (1983) establecen 100 grados entre los mismos extremos. Ninguno de los autores citados define

Tabla IV: Características promedio de las plantas en los estadios inoculados, cultivadas en cámara bioclimática.

Estadio	Edad (días)	Nºde hojas expandidas	Altura del tallo (cm)	Botón floral (diám. en cm)
I: Vegetativo	30	10	18	ausente
II: Botón floral cerrado	37	12	25	visible
III: Botón floral cerrado	44	14	42	0,6
IV: Botón floral abierto	51	27	50	2,2

los síntomas en los que basa los grados de severidad intermedios entre los extremos. Por otro lado Auger y Nome (1970) consideran, únicamente, el número de plantas muertas al 15º día después de la inoculación.

El empleo de un único índice parece incompleto, pues no permite reflejar los distintos componentes de la susceptibilidad expresados más arriba. Por ello se creyó aconsejable incorporar el mayor número de caracteres sintomáticos que presenta esta enfermedad, a fin de lograr una evaluación integral.

Las plantas se evaluaron hasta el día de la cosecha (5º día después de la inoculación) a través de los siguientes parámetros:

- a) El porcentaje de plantas enfermas
 - b) La velocidad de aparición de lesiones visibles
 - c) La velocidad de desarrollo de las lesiones: se midió la longitud de las mismas desde su margen inferior al superior a partir de su día de aparición y hasta el día de la cosecha.
 - d) El porcentaje de lesiones limitadas y de aquellas que rodeaban la totalidad del tallo, al 5º día. Esta observación sirve para indicar el grado de resistencia al desarrollo lateral (Fig. 5).
 - e) El porcentaje de tallos huecos y la velocidad de aparición de este síntoma.
 - f) La velocidad de aparición de la marchitez, así como su tipo y grado. Con respecto al tipo se determinaron arbitrariamente dos grandes clases: incipiente (hojas levemente flácidas) y permanente (hojas totalmente flácidas, y en ocasiones hasta necrosadas). Sobre la base de la presencia de la marchitez y del porcentaje de hojas con los distintos tipos de la misma por planta, se establecieron 5 grados, a saber:
 - 0: plantas sin síntomas de marchitez
 - 1: plantas con 1-50% de hojas con marchitez incipiente
 - 2: plantas con 51-100% de hojas con marchitez incipiente
 - 3: plantas con 1-50% de marchitez permanente
 - 4: plantas con 51-100% de marchitez permanente
- El índice de marchitez (IM) se calculó según la fórmula descrita al comienzo de este punto.
- g) De la combinación de los síntomas tallo hueco y 100% de hojas con marchitez permanente surge el criterio de "planta muerta". Se determinó el porcentaje de muertes acontecidas al día de la cosecha y la velocidad de aparición de las mismas.

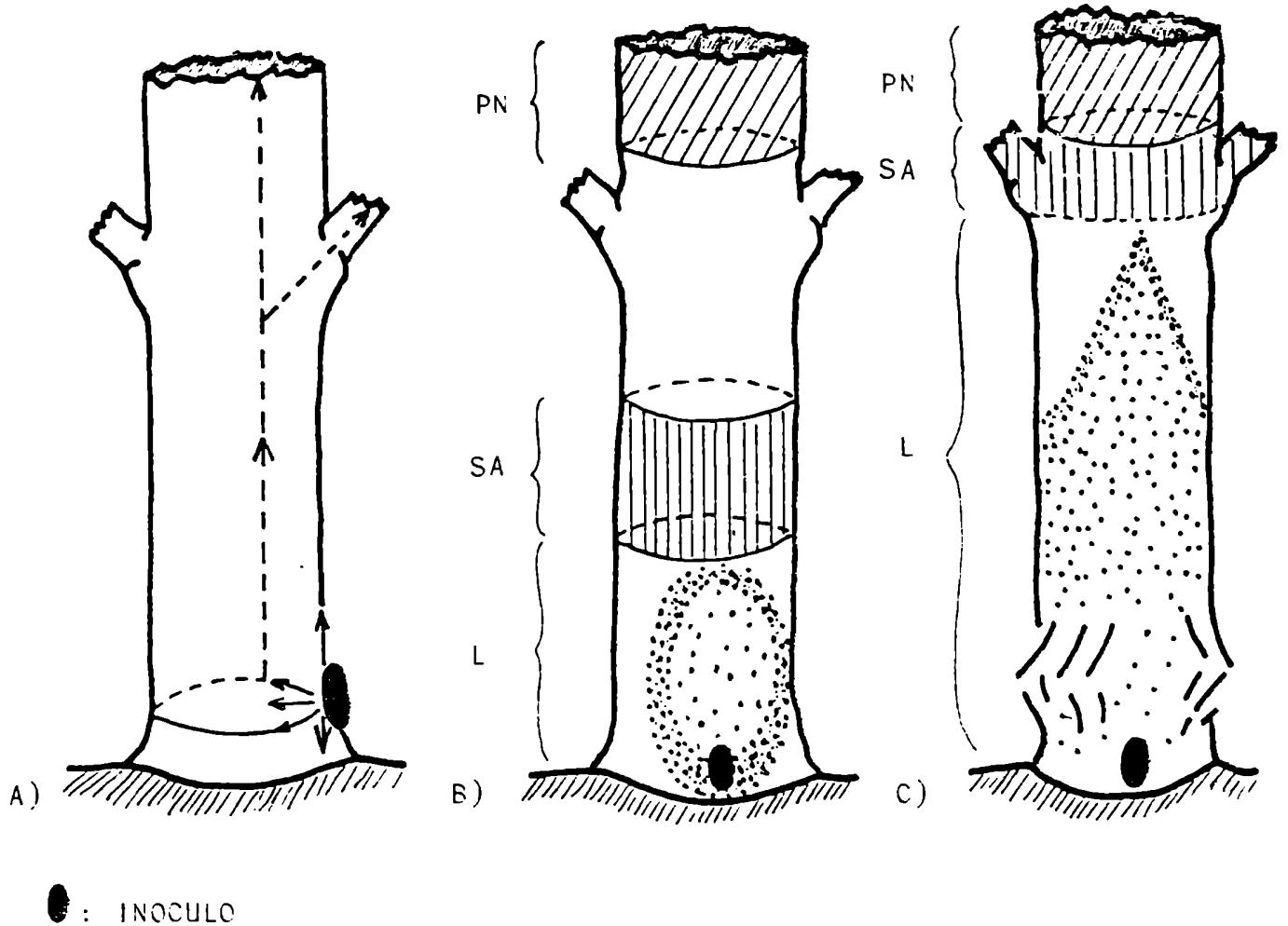


Figura 5: Colonización fúngica y zonas del tallo estudiadas. A: en línea llena, dirección del crecimiento micelial en el tallo; en línea discontinua, distribución del ácido oxálico hacia las zonas superiores del tallo y follaje. B: esquema de un individuo tolerante; C: esquema de un individuo susceptible. L: lesión; SA: zona sana adyacente a L y PN: segmento ubicado por encima del primer nudo verdadero.

- h) Por último, y como consecuencia de la observación de los síntomas propios de esta enfermedad se determinó el porcentaje de plantas con las siguientes características opuestas: "mancha húmeda" y "mancha seca"; "lesiones claras" y "lesiones oscuras" (o de bordes oscuros); y por último "lesiones con bordes definidos" y "lesiones con bordes difusos".

11.2.5. Métodos para el estudio de los distintos componentes de la defensa

11.2.5.1. Estado nutricional del hospedante

11.2.5.1.1. Contenido de azúcares solubles totales

El contenido de azúcares totales de los extractos acuosos obtenidos de las lesiones de tallos inoculados y de tejidos similares de tallos testigo de las distintas edades se determinó según el método que se describirá a continuación. Las plantas habían crecido en cámara bioclimática, con 16 hs de período lumínico.

Para la cuantificación de azúcares totales se utilizó el método colorimétrico del fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). Alícuotas de los mencionados extractos (aproximadamente 5 μ l) se agregaron a 0,8 ml de agua destilada. Luego se agregó 0,05 ml de fenol al 80% (sol. acuosa) y por último 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras se agitaron y calentaron 10' en baño de María a 100°C. Una vez retiradas se las dejó reposar durante 30' y se determinó su absorbancia a 490 nm. La cantidad de azúcares solubles se determinó a partir de una curva patrón de glucosa.

11.2.5.1.2. Contenido de aminoácidos libres

Se los determinó en los extractos acuosos obtenidos según el método descrito en el 11.2.5.2.1.2. (Hara y Matsubara, 1980). Se analizaron las lesiones de tallos inoculados y tejidos similares de tallos testigo de distintas edades, cultivadas en cámara bioclimática con 16 hs de período lumínico.

El método empleado para cuantificación consistió en agregar 1 ml de solución de ninhydrina (0,4% de ninhydrina, 0,008% SnCl₂, 15% de metilcelosolve), y 0,4 M de buffer acetato de sodio, pH 5,5 a alícuotas del extracto en cuestión. La mezcla se calentó durante 15' en baño de agua a 100°C. El color de la reacción se leyó luego a 570 nm. La cantidad de aminoácidos

libres en las alícuotas se determinó a partir de una curva patrón de β al-
nina comercial. Diversas alícuotas de una solución madre del mencionado
aminoácido (10-50 μ g) se procesaron como se indicó precedentemente.

11.2.5.1.3. Contenido de Calcio

La concentración total de calcio en los tejidos se determinó por
medio del método utilizado por Bateman y Lumsden (1965).

11.2.5.2. Mecanismos bioquímicos de defensa

11.2.5.2.1. Obtención de extractos vegetales

11.2.5.2.1.1. Extractos acuosos obtenidos en frío

El tejido proveniente de la zona del tallo a estudiar (4-8 plantas
por extracto) fue molido y luego se lo homogeneizó en buffer tris HCl 1 mM
(pH 7), en un homogeneizador. Se utilizó aproximadamente 50 ml de buffer
por cada 20 gr de tejido fresco. Luego de 5', el extracto se filtró y ultra-
centrifugó a 10.000 xg. El precipitado se descartó. El contenido de materia
seca de los sobrenadantes se determinó gravimétricamente. Este extracto acuo-
so finalmente obtenido se separó en dos volúmenes que se emplearon en bio-
ensayos. A uno se lo esterilizó en autoclave durante 25', a una atmósfera
de presión, y al otro por medio de un filtro Sartorius con poro de 0,2 μ m
de diámetro.

11.2.5.2.1.2. Extracción con el sistema agua-etanol-cloroformo

Las muestras a ser extraídas se conservaron a -20°C . La humedad de
las mismas se determinó tomando una alícuota que se llevó a peso seco cons-
tante en estufa a 75°C . Para cada edad se agruparon los trozos de tallos
obtenidos de la zona de avance del patógeno de todos los individuos, los
que se agruparon en una muestra única (8-12 plantas por edad), con el fin
de contar con el material necesario para análisis posteriores. Igualmente
se estudiaron tejidos similares de plantas testigo.

El material molido (5-15 gr de peso fresco de acuerdo con la edad en estudio) se extrajo cuantitativamente con agua. El residuo fue luego extraído con etanol absoluto y finalmente con cloroformo. En todos los casos las extracciones se realizaron durante 12 horas; en Soxhlet a la temperatura de ebullición del solvente correspondiente. Los extractos clorofórmico y etanólico se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio con vacío, a 35°C, y se resuspendieron en agua para realizar los correspondientes ensayos biológicos. El experimento completo se repitió dos veces. El esquema de las extracciones se resume en la Fig. 6.

11.2.5.2.1.3. Extractos metanólicos

Se siguió la metodología descrita en 11.2.5.2.2.1.

11.2.5.2.2. Compuestos fenólicos

11.2.5.2.2.1. Extracción

Un aspecto importante a considerar para la extracción de los compuestos fenólicos es la posibilidad de que estos sufran alteraciones durante dicho proceso. Las células vegetales contienen numerosas enzimas diferentes que pueden modificar los mencionados compuestos. Entre ellas se destacan las polifenoloxidasas y glucosidasas. A fin de evitar posibles alteraciones el material a analizar se conservó a -20°C, hasta el momento en que se lo analizó.

Se tomó una cantidad medida de material (0,5-5 gr de peso fresco) la que inmediatamente se transfirió a metanol 80% en ebullición a fin de inactivar las mencionadas enzimas. El material fue luego cortado con bisturí en trozos pequeños y macerado con metanol 80% en un homogeneizador. El método se basó en la técnica general para el estudio de estos compuestos (Ribereau-Gayon, 1972) que consiste en extracciones metanólicas sucesivas. La mezcla vegetal se hirvió suavemente sobre una placa caliente y luego se filtró en vacío. Para la puesta a punto del método se ensayaron extracciones sucesivas, con distintos tiempos de duración. Al finalizar cada una, el extracto se filtró y guardó para la posterior cuantificación de fenoles

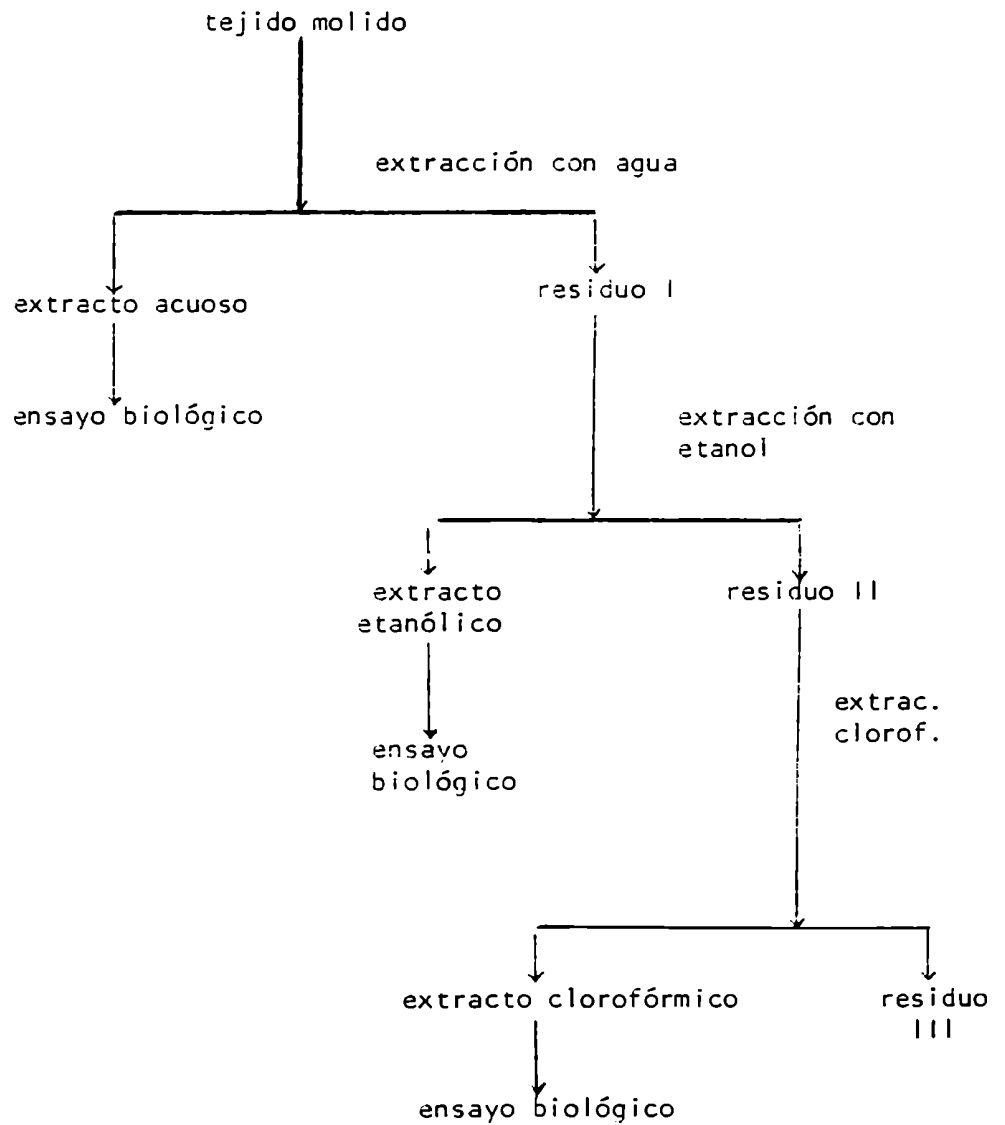


Figura 6: Esquema de extracción del material vegetal con el sistema agua - etanol - cloroformo.

en el mismo (confrontar el método en el punto 11.2.5.2.2.2). Los compuestos fenólicos se extrajeron, cuantificaron y analizaron en las distintas zonas de tallos testigos e inoculados de las tres edades cultivadas en cámara bioclimática, en plantas cultivadas a campo y en H. tuberosus. En todos los casos se excluyó la médula.

11.2.5.2.2.2. Cuantificación

- a) Método colorimétrico para la cuantificación de fenoles totales solubles en agua o metanol (Kritzman y Chet, 1980), o compuestos fenólicos aislados individuales o en mezclas.

Se analizó individualmente el contenido de fenoles totales en las zonas de las lesiones (L), "sanas adyacentes" (SA) (segmentos de tallo de 1 cm de longitud a partir del margen superior en la lesión) (Fig. 5) y del "primer nudo" (P) (segmentos de tallo de 1 cm de longitud por encima del primer nudo verdadero).

Alícuotas del extracto a estudiar (20-50 μ l) se llevaron a 0,1 ml con agua destilada. Luego se les agregó 1 ml de CO_3NH_4 saturado y agitó durante 3'. Finalmente, a cada muestra se le adicionó 3 ml de una mezcla consistente de 50 partes de una solución compuesta por 20 gr de NaCO_3 y 4 gr de tartrato de Na y K en un litro de agua destilada, y una parte de otra con 5 gr de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada. Luego de incubar a 37°C durante 7'; se agregó 0,1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (1 N). La muestra se dejó reposar durante 30' y se determinó luego la absorbancia a 650 nm. La cantidad de fenoles totales en la muestra se calculó sobre la base de una curva standard de ácido clorogénico. Para esto se preparó una solución madre del mencionado compuesto, de la cual se extrajeron alícuotas que contuvieron 5, 10, 15 y 20 μg del mismo.

- b) Método espectrofotométrico para la cuantificación de compuestos individuales.

Las concentraciones de los ácidos clorogénico e isoclorogénico, eluidos de los cromatogramas de extractos provenientes de tallos sanos y enfermos de los distintos estadios estudiados, se determinaron a partir de sus espectros de absorción a la luz ultravioleta. Para ello se aceptó que sus

coeficientes de extinción milimoleculares para 328 nm son 20 y 40 respectivamente (Corse et al., 1965).

En el caso de compuestos fenólicos no identificados, se quiso conocer si sus concentraciones relativas variaban de acuerdo con la edad o estado sanitario del hospedante. Para ello se compararon los picos de absorción máxima de los compuestos supuestamente iguales aislados en alícuotas provenientes de idénticas cantidades de peso fresco de tejido inicial extraído.

c) Método para la corrección del cálculo de las concentraciones in vivo de los compuestos fenólicos.

Las superficies de los tejidos xilemáticos y "cortical" (corteza, parénquima interfascicular y floema) se calcularon a partir de los pesos de los dibujos de cada tejido en cortes transversales de tallos. Los dibujos se realizaron con la cámara clara de un microscopio óptico, sobre papel de calco vegetal. Dado que las proporciones de cada tejido varían con las distintas alturas del tallo se consideró que su volumen podría asemejarse al que corresponde a un cono circular recto truncado. A fin de calcularlo se aplicó la siguiente fórmula:

$$V: \frac{1}{3} \cdot \pi \cdot h \cdot (R_1^2 + R_1 \times R_2)$$

h: longitud promedio de las lesiones de tallos de cada edad

R₁: radio promedio de la sección transversal del tallo correspondiente al límite superior promedio de las lesiones.

R₂: radio promedio de la sección transversal del tallo correspondiente a la base de las lesiones.

Se supuso que los pesos específicos de los tejidos tanto xilemáticos como no xilemáticos eran similares, de tal forma que sus volúmenes relativos eran equivalentes a sus pesos relativos. Una vez estimado el peso de cada tejido se sustrajo, del peso inicial de tejidos extraídos, el peso del xilema que no contiene fenoles. De esta forma fue posible referir la concentración de fenoles respecto al peso fresco de tejidos que los acumulan.

- d) Cálculo del porcentaje de recuperación de ácido clorogénico comercial sujeto a cuantificación espectrofotométrica.

Con el objeto de conocer la eficiencia del método empleado se sembró una cantidad ajustada de ácido clorogénico comercial en papel de cromatografía Whatman N°3 MM. El cromatograma se desarrolló mediante técnica unidimensional descendente, en B:Ac:A (Tabla V). Luego de secado, la localización del compuesto se determinó bajo luz U.V. La mancha fluorescente fue recortada y eluida según se describe en 11.2.5.2.2.3. La absorbancia de una alícuota adecuada fue determinada en el espectrofotómetro, a 325 nm. El contenido de ácido clorogénico en la misma se calculó a través de su coeficiente de extinción milimolecular (20, valor para Corse et al., 1965). Se calculó el porcentaje de pérdida respecto a la cantidad inicial utilizado del compuesto.

11.2.5.2.2.3. Estudios cualitativos

- a) Estudios generales en extractos no hidrolizados

La separación y caracterización de los compuestos fenólicos presentes en los extractos acuosos y metanólicos se llevó a cabo por medio de métodos cromatográficos, analíticos y espectrofotométricos standard (Ribereau-Gayon, 1972).

Los extractos fueron concentrados en un evaporador rotatorio, bajo vacío, a 40°C. Alícuotas de los concentrados fueron sembrados sobre papel de cromatografía para su análisis. Se empleó una técnica bidimensional descendente. Los sistemas de solventes empleados fueron: en la 1ª dirección B:Ac:A y en la 2ª Ac. al 2% (Tabla V). Una vez secos, los cromatogramas fueron observados bajo luz U.V. Los criterios utilizados para su caracterización fueron:

- el color de la fluorescencia a la luz U.V. (366 nm) antes y después de la exposición a los vapores de una solución de OHNH_4 .
- la comparación de los R_f obtenidos en diversos solventes con aquellos indicados en la bibliografía. Debido a que estos datos pueden variar ligeramente de una experiencia a otra, se realizó una confirmación suplementaria a través de la cromatografía simultánea de los compuestos aislados y adquiridos comercialmente.
- coloraciones obtenidas a partir de la utilización de diversos reveladores.

Tabla V: Lista de los solventes cromatográficos usados en este trabajo.

<u>Abreviaturas</u>	<u>Fórmula</u>
B:Ac:A	butanol:ác. acético:agua 6 1 2
2% Ac.	2 ml ác. acético en 95 ml de agua
Be:Ac:A	Benceno:ác. acético:agua (fase superior) 6 7 3
OHNa:Fo:A	hidróxido de sodio 1 N: ác. fórmico:agua 150 8 42
B:Fo:A	butanol:ác. fórmico:agua 10 3 10

Se emplearon los siguientes reactivos: Cl_3Fe 1%; p-nitroanilina diazotizada; AlCl_3 , Folin-Ciocalteu (Ribereau-Gayon, 1972) y el test de Hoepfner-Vorsatz o del ácido nitroso (Reeve, 1951) (Tabla VI).

b) Análisis de los compuestos fenólicos en extractos hidrolizados.

Los compuestos fenólicos raramente se hallan en forma libre en los tejidos vegetales. Practicamente siempre se los encuentra en forma conjugada como ésteres o glucósidos.

La determinación de las moléculas constitutivas de los derivados hidroxicinámicos así como el tipo de unión existente entre ellos puede ser realizado a través de la hidrólisis de esos compuestos.

Hidrólisis básica: alícuotas de los extractos acuosos y metanólicos completos se evaporaron a sequedad y redisolviéron en un mismo volumen de agua. En vacío, en un evaporador rotatorio se agregó dos ml de NaOH 2 N a la solución y se dejó actuar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de transcurrido ese tiempo, la solución se acidificó hasta pH 3 con HCl concentrado.

Hidrólisis ácida: se efectuó en un baño María a 100°C , en presencia de HCl 2 N, durante 1 h.

Los compuestos aromáticos, liberados de sus formas combinadas fueron extraídos de los hidrolizados por partición con eter etílico. Se realizaron 3 extracciones sucesivas.

Identificación de ácidos fenólicos libres

Los ácidos fenólicos libres, presentes en las fases etéreas se separaron por cromatografía en capa delgada de celulosa. El extracto etéreo reunido y concentrado se sembró, y desarrolló por medio de una técnica bidimensional ascendente. Los sistemas de solventes empleados fueron: en la 1ª dirección Be:Ac:A y en la 2ª OHNa:Fo:A (Tabla V).

Los ácidos fenólicos libres se detectaron observando las placas bajo luz U.V. (366 nm) y revelándolas con el reactivo del ácido sulfanílico (Tabla VI). Las características de posición en la placa, coloración de

Tabla VI: Lista de reveladores utilizados en este trabajo.

- p-nitroanilina diazotizada:

- 1 ml 0,5% p-nitroanilina (0,5% a/v en 2N/HCl)
- 0,1 ml 5% nitrato de sodio
- 5 ml 2 M carbonato de sodio
- 5 ml de agua

- Folin Ciocalteu:

preparación comercial en agua (1:5)

- Reactivo del Acido sulfanílico:

- a) Ac. sulfanílico 9 mg
- HCl concentrado 90 ml
- Agua 900 ml
- b) Nitrato de sodio 5% en agua
- c) Carbonato de sodio 10% en agua

Al momento de usar se mezclan 1 vol. de a), 1 vol. de b) y 2 vol. de c)

- Reactivo del ác. nitroso o de Hoepfner-Vorzat

- a) nitrito de Na 1% en ác. acético 10%
 - b) hidróxido de potasio 5% en agua
- Rociar primero con a), dejar secar y aplicar b)

- Tricloruro de aluminio: solución alcohólica de $AlCl_3$ al 1%

- Cloruro férrico: 1% en agua

- Bromo cresol verde (reactivo para ácidos orgánicos)

- a) Bromo cresol verde 75 mg
- Bromo fenol azul 25 mg
- Etanol 100 ml
- b) Permanganato de potasio 250 mg
- Carbonato de sodio 500 mg
- Agua 100 ml

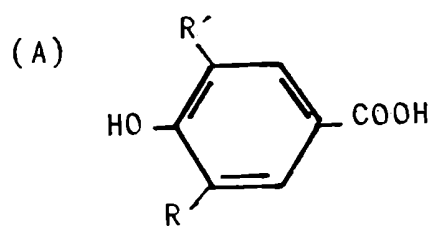
Se mezclan 9 vol. de a) y 1 vol. de b)

fluorescencia y reacción con el revelador se contrastaron con aquellas de ácidos fenólicos comerciales. Como marcadores estándar de los ácidos cinámicos se emplearon los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinapico; y de ácidos benzoicos los ácidos p-hidroxibenzoico, protocateico, vanílico y síringico. Para estructuras ver la Figura 7.

c) Identificación de compuestos fenólicos aislados

Los compuestos principales fueron localizados en el papel por fluorescencia y sus manchas recortadas se extrajeron con metanol 80% , en oscuridad, a temperatura ambiente. Alícuotas de estos compuestos aislados fueron analizados espectrofotométricamente. Se las ubicó en microceldillas de cuarzo de 1 cm de abertura. En todos los casos se usó como blanco, metanol 80%. Los espectros de absorción fueron determinados entre 440-250 nm. Los derivados hidroxicinámicos absorben la luz U.V. y el estudio de los espectros de absorción de un determinado compuestos aporta indicaciones interesantes de su estructura. Así, Jurd (1957), Sutherland (1958) y Guern (1965) han estudiado la influencia de la esterificación sobre los espectros de los ácidos fenólicos a distintos pH. En consecuencia se estudiaron los espectros en soluciones metanólicas ácidas y alcalinas a fin de conocer la existencia y magnitud de los desvios batocrómicos. A otras alícuotas de los compuestos aislados se las hidrolizó según se detalló en : 11.2.5.2.2.3.b. El componente fenólico del compuesto se caracterizó por medio de la metodología descrita en el mismo punto.

En el caso de los compuestos inhibidores se estudiaron también los residuos unidos a la aglicona (azúcares, ácidos orgánicos), luego de hidrolizar. Para ello es necesario eliminar primero el exceso de alcali. Este se extrajo utilizando una resina de intercambio catiónico Dowex 50 W-78, 20-50 U.S Smesh (H). La resina hidratada en agua se acidificó con ClH 1 N durante 2 hs. Luego se decantó el ácido y se lavó varias veces con agua destilada hasta llegar a pH neutro. El extracto hidrolizado se mezcló con el doble de su volumen de solución de resina. Luego de una buena agitación se filtró en vacío. La resina se lavó con igual volumen de metanol 80% y se filtró nuevamente. Los filtrados se reunieron y concentraron en un evaporador rotatorio.

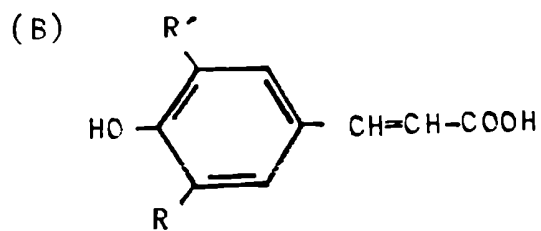


R = R' = H; p-hidroxibenzoico

R = OH, R' = H; protocateico

R = OCH₃, R' = H; vainilico

R = R' = OCH₃; siríngico



R = R' = H, p-cumárico

R = OH, R' = H, cafeico

R = OCH₃, R' = H; ferúlico

R = R' = OCH₃; sinápico

Figura 7: Estructuras de los ácidos benzoicos (A) y cinámicos (B)

El material así obtenido se sembró en placas de celulosa. Para el estudio cromatográfico se empleó una técnica unidimensional ascendente. El sistema de solventes utilizado fue B:Fo:A (Tabla V).

Una vez concluida la corrida se secaron muy bien las placas con una corriente de aire caliente a fin de eliminar todos los vestigios de remanentes ácidos del solvente. Finalmente se procedió a revelar las placas con un reactivo apropiado para la detección de ácidos orgánicos, que se detalla en la Tabla VI (Ribereau-Gayon, 1972). A fines comparativos se emplearon los siguientes marcadores: ácidos quínico, cítrico y succínico.

11.2.5.2.2.4. Localización anatómica

Fijación

Se probaron los siguientes fijadores:

- 1) FAA (formol-ácido acético-alcohol)
- 2) Alcohol 70%
- 3) Glutaraldehido 5%

Los dos primeros fijadores son de uso universal. Sin embargo, debido a su contenido alcohólico solubilizan a los compuestos fenólicos, por lo que se los perdía en esta primera etapa.

Estudios referidos específicamente a técnicas para el análisis de fenoles en cortes anatómicos aconsejan el uso del glutaraldehido como medio de fijación del material a estudiar (Brisson *et al.*, 1977). En nuestro caso no se obtuvo la eficacia deseable ya que se observó cierta difusión de los fenoles al medio. Como conclusión final se decidió estudiar el material en fresco. Esto trajo aparejado ciertos inconvenientes dada la necesidad de realizar todos los estudios el mismo día en que se obtuvieron las muestras.

Inclusión

En los primeros ensayos se utilizó el método de inclusión en parafina. De inmediato se lo descartó debido a que uno de los pasos incluye el pasaje del material por una serie de alcoholes a fin de deshidratar el tejido. Esto traía aparejada la extracción de los compuestos interesados.

Consiguientemente, se optó por realizar los cortes a mano alzada.

Montaje y métodos de localización

Para la localización de los fenoles en cortes transversales de tallo se emplearon dos tipos de métodos: a) histoquímicos y b) de autofluorescencia.

- a) Los métodos histoquímicos se basan en la reacción de los compuestos fenólicos con diversos reactivos para dar origen a compuestos coloreados. Se emplearon los siguientes reactivos:

FeCl_3 3% en solución acuosa (Brisson et al., 1977)

Reactivo de Hoepfner y Vortsatz (Reeve, 1951) (Tabla VI).

El reactivo de FeCl_3 reacciona con compuestos fenólicos produciendo un color verde grisáceo oscuro, y el reactivo de Hoepfner y Vorsatz produce un color entre amarillo y rojo fuerte de acuerdo con el compuesto con el que reacciona (Tabla VII).

Si bien las reacciones obtenidas con ambos agentes fueron muy intensas, la localización exacta de los compuestos se enmascara por su rápida difusión al medio. Para evitar dicha difusión se intentó inmovilizar los fenoles mediante el montaje en gelatina glicerizada.

- b) Este método de autofluorescencia se basa en la propiedad de una gran parte de los compuestos fenólicos, de emitir una fluorescencia de color característico al ser expuestos a la luz U.V. en ausencia y presencia de vapores de amonio (0,1M de solución de hidróxido de amonio, pH 10,3). Mediante este método fue posible localizar no solo los compuestos solubles sino también los insolubles unidos a las paredes celulares (Koga et al., 1979; Harris y Hartley, 1976).

Los cortes transversales de los tallos se observaron en un microscopio de fluorescencia.

Tabla VII: Reacción de distintos compuestos fenólicos con el reactivo de Hoepfner-Vorzat (extraído de Reeve, 1951).

Sustancia	Color de la reacción
Catecol	Rojo oscuro persistiendo más de una hora
Acido clorogénico	Como con catecol
Hidroquinona	Rojo-castaño, castaño claro al pasar varios minutos
Orcinol	Castaño rojizo muy oscuro
Parafenildiamina	Anaranjado rojizo, haciéndose luego castaño rojizo turbio
Fenol	Amarillo claro
Floroglucinol	Amarillo, cambiando a castaño oscuro
Acido pirogálico	Rojo brillante, cambiando a castaño oscuro
Quercetina	Ambar a castaño
Quercitrina	Castaño rojizo
Resorcinol	Anaranjado, cambiando a castaño
Rutina	Castaño rojizo
Acido tánico	Amarillo claro a castaño
Vanillina	Amarillo claro

Hidrólisis de los compuestos fenólicos unidos a las paredes celulares (Harris y Hartley, 1976).

Los residuos de ácidos fenólicos unidos a ciertas paredes celulares se liberaron de las mismas mediante la incubación de cortes transversales de tallos con una solución de hidróxido de sodio 1,0 M, a 20°C, durante 16 hs. Cortes similares fueron incubados en celulasa comercial cruda (Aspergillus niger, Sigma 2,5 mg.ml⁻¹ en buffer 0,2 M NaOH-AcOH, a pH 4,8, que contenía NaN₃ al 0,02%) a 37°C, durante 16 hs. Los cortes se observaron luego en un microscopio de fluorescencia.

11.2.5.2.3. Bioensayos

Alícuotas de los distintos extractos obtenidos se concentraron a sequedad en un evaporador rotatorio, a 40°C. En caso de tratarse de extractos clorofórmicos se los llevó a sequedad a temperatura ambiente. Los residuos se disolvieron en agua. A dicha solución se le agregó luego extracto de malta al 0,1% y finalmente agar al 2%. Los residuos clorofórmicos en agua estuvieron sujetos a la acción de ultrasonido, a fin de lograr una suspensión homogénea. En algunos casos, los residuos fueron disueltos en el medio mineral definido de Hancock (confrontar 11.2.1.b). Se probaron concentraciones entre 50 y 300 mg de peso fresco de tejido inicial/ml de medio.

Los compuestos fluorescentes individuales o en mezclas se eluyeron de los cromatogramas y llevaron a sequedad del modo descrito anteriormente. Los residuos se disolvieron en 10 ml de medio mineral definido (Hancock, 1966; 11.2.1.b., el cual contiene pectina como única fuente carbonada, de manera de obtener una concentración final de 300 o 400 mg de peso fresco inicial/ml de medio. En el caso de los compuestos identificados como ácido clorogénico e isoclorogénico, y de los ácidos fenólicos comerciales se utilizaron diferentes concentraciones de cada uno de ellos que fueron desde 0,1 a 3 mg/ml de medio. En los primeros experimentos se utilizaron cajas de Petri que contenían 15 ml de medio cada una. Luego el método se modificó empleándose tubos de 9X2 cm que contenían solo 2 ml de medio cada uno. Esta modificación resultó muy conveniente ya que se redujo en gran medida el contenido de medio y por consiguiente de material vegetal inicial,

especialmente en el caso del estudio de compuestos aislados.

El pH de los medios se ajustó a 5,5 con HCl o OHNa 0,1 N. Luego de esterilización en autoclave, los tubos se dejaron solidificar en posición horizontal.

Cada tubo o caja fue inoculada esterilmente en su extremo con un disco de agar extracto de malta 1% (5 mm de diámetro) cubierto por el micelio del hongo. Este había crecido previamente en dicho medio durante 5 días, a 25°C. Las cajas y/o tubos se incubaron a la temperatura indicada. Los radios de las colonias fúngicas fueron medidos diariamente hasta el 7º día después de la inoculación. Se utilizaron entre 5-10 repeticiones por tratamiento.

Sobre la base de los crecimientos promedio del hongo al 6º o 7º día se calculó el porcentaje de acción provocada por el medio con extracto, o compuesto a probar, respecto al testigo (medio basal sin agregados), de la siguiente manera:

$$A = \frac{r_T - r_o}{r_o} \times 100$$

r_T : radio promedio (cm) de la colonia en el medio con extracto o compuesto.

r_o : radio promedio (cm) de la colonia en el medio basal sin agregados

Si el signo del porcentaje resultante fue positivo, la acción se consideró promotora. De lo contrario, el efecto fue inhibitorio.

Otro parámetro considerado fue el efecto de los extractos o compuestos en los medios sobre el número y peso seco de los esclerocios, respecto al obtenido en el medio testigo.

11.2.5.3. Mecanismos histológicos de defensa

Con el fin de detectar eventuales barreras mecánicas de tipo pre o postinfeccionales se realizaron estudios anatómicos de tallos sanos y enfermos de las distintas edades. Se analizaron cortes transversales de distintas zonas de los tallos enfermos: base, margen de la lesión y tejidos sanos adyacentes; y tejidos similares de plantas testigo. Para cada zona se realizaron 4 cortes. Se estudiaron 4 plantas por tratamiento. El experimento completo se repitió 3 veces.

Los cortes fueron incluidos en parafina, cortados con micrótopo de deslizamiento y teñidos con diversos colorantes: violeta de cresil (Dizeo de Strittmatter, 1980); fast-green y fucsina básica.

Para los estudios sobre el grado de lignificación de los tejidos se emplearon cortes no incluidos. Se utilizó el método del floroglucinol CIH (Orellana, 1975). Este se basa en la propiedad del mencionado compuesto de reaccionar con los aldehídos unidos al polímero de lignina, produciendo un color rojo profundo. Dado que ciertos polímeros de lignina inducidos postinfeccionalmente pueden diferir de aquellos de las plantas sanas y no reaccionar con dicho reactivo, los cortes también se observaron con un microscopio de fluorescencia. La lignina, por ser un polímero fenólico formado principalmente por la condensación de radicales libres de alcoholes hidroxicinamílicos, posee la característica de fluorecer al ser expuesto a la luz U.V.

Para la determinación de la variación del volumen de los distintos tejidos con la edad de la planta se utilizó el método descrito 11.2.5.2. 2.2.c.

11.2.6. Análisis estadístico

Los promedios de los tratamientos se compararon estadísticamente mediante el Análisis de la Varianza (Sokal, 1965). Para los contrastes se utilizó el Test de Scheffé (Sokal op.cit.). En el caso de porcentajes se utilizó la transformación arcoseno. En los casos en que no se cumplieron las hipótesis del análisis de varianza se usó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Hollander y Wolfe, 1973). Para el estudio de curvas se empleó el análisis de regresión, correlación y test de igualdad de pendientes para varias líneas de regresión (Sokal, op.cit.). La independencia se comprobó con el Test de la G (Sokal op.cit.).

III. RESULTADOS, DISCUSION Y CONCLUSIONES PARCIALES

III.1. Efecto de la edad del hospedante en la predisposición

III.1.1. Introducción

De acuerdo con lo expresado en los antecedentes bibliográficos las plantas varían con la edad en su susceptibilidad a la enfermedad. Esta también responde a la influencia del cambio de los factores ambientales a lo largo del ciclo vital de las plantas salvo cuando ellas crecen en condiciones controladas.

Los estudios sobre el efecto de la edad del huésped en la predisposición a un determinado patógeno pueden ser realizados en el campo o en cámara bioclimática. Los invernáculos ofrecen situaciones intermedias ya que en ellos es posible controlar el riego y la presencia de pestes y patógenos no deseables, pero difícilmente la luz y la temperatura. La cámara bioclimática provee del control del ambiente necesario para investigar los efectos de la edad y de los factores ambientales por separado y/o en distintas combinaciones, manteniendo constantes aquellos deseados. En cuanto a las desventajas, dos son las principales: el limitado número de individuos estudiados por ensayo; y las diferencias en el crecimiento, respecto a las plantas crecidas bajo condiciones naturales, que se hacen particularmente evidentes en las edades adultas. Este último inconveniente se agudiza en casos como el de girasol por tratarse de una planta de gran porte y sistema radical muy extendido.

En cuanto a los ensayos a campo, es posible manejar un elevado número de repeticiones, aunque en un solo momento del año. Por otro lado, la imposibilidad de separar el efecto edad del correspondiente a los factores ambientales que cambian a lo largo del ciclo ontogénico de la planta, exige la repetición de los ensayos durante un número de años considerable, para poder contar con datos valederos.

Un balance de las ventajas y desventajas que los distintos métodos ofrecían llevó a la decisión de encarar esta investigación por medio del

estudio de plantas cultivadas en cámara bioclimática; y en forma complementaria realizar ensayos, a fines comparativos, con materiales crecidos en condiciones naturales.

Auger y Nome (1970) determinaron, a campo y en invernáculo, una curva de susceptibilidad del girasol en función de la edad de inoculación. Teniendo en cuenta el hecho de que los experimentos de campo fueron realizados en una sola estación y que no se conocen las condiciones en las que se efectuó el ensayo en el invernáculo, se consideró necesario realizar un estudio preliminar sobre la incidencia de la edad de la planta en la predisposición a S. sclerotiorum, en condiciones controladas de crecimiento. En esta forma se podría contar con un sistema y condiciones de fácil reproducibilidad para realizar estudios sobre los mecanismos de defensa.

A tal fin, se realizaron curvas de susceptibilidad variando únicamente la longitud del fotoperíodo: 12 y 16 horas III.1.4. No se incluyeron en el estudio edades muy adultas debido a que en las mismas las desviaciones de crecimiento y desarrollo respecto a las plantas crecidas a campo se incrementaban. En este capítulo preliminarmente, se describirán los ensayos realizados a fin de seleccionar el método III.1.2 y la zona de inoculación III.1.3. Ambos constituyen aspectos básicos para el logro de los objetivos planteados.

III.1.2. Método de inoculación

a) Inoculaciones secuenciales versus simultáneas

Populer (1978) sugiere que una manera de disminuir la fuente de variación no explicada por el factor edades, además del cultivo bajo condiciones ambientales constantes, la de uniformar el inóculo a través de inoculaciones simultáneas. De este modo es posible evitar eventuales cambios en la concentración e infectividad del patógeno.

Para lograr este objetivo fue necesario realizar siembras sucesivas de tal forma de contar con plantas de distintas edades a un mismo tiempo. Sin embargo, dado las limitaciones de espacio, las plantas más jóvenes,

y que por lo tanto habían sido sembradas al final del ensayo, crecieron en condiciones desfavorables. Esto hizo imposible compararlas con las que no se vieron obstaculizadas en su crecimiento, a pesar de que se las ubicó a igual distancia de la fuente lumínica. Dado que el error introducido era sin duda mayor que el que se pretendía evitar, se decidió utilizar el método de las inoculaciones sucesivas.

b) Comparación de dos tipos de inóculo

De acuerdo con lo mencionado en los antecedentes bibliográficos, la podredumbre basal se produce, en condiciones naturales, a través de la infección por hifas provenientes de esclerocios germinantes presentes en el suelo o sobre restos de cosechas. Los sitios de infección serían las raíces o el cuello de las plantas.

Los métodos de inoculación artificial empleados en trabajos previos pertenecen a dos tipos principales:

- i) Métodos que ubican al inóculo en el interior del hospedante y que por lo tanto incluyen la producción de heridas: ia) Método del mondadien-tes infectado con micelio (Auger y Nome, 1970); ib) Método del bloque de medio de cultivo infectado que se ubican en heridas previamente provocadas con bisturí (Vrânceanu, 1977), ic) Inyección en el tallo de una suspensión de esclerocios molidos (Vrânceanu, op. cit.) etc.
- ii) Métodos en los cuales el inóculo se ubica superficialmente en la zona basal del tallo: iia) Método del bloque de medio de cultivo infectado, cubierto con tierra (Orellana, 1975); iib) Inoculación por medio de tejidos susceptibles de otras especies vegetales previamente esterilizados e inoculados con el patógeno (Teyssandier, com.pers.); iic) Combinación de los anteriores: se ubica sobre el tallo una determinada cantidad de avena arrollada y sobre esta un bloque de medio de cultivo infectado (Noyes y Hancock 1981).

Desde el comienzo se descartó el primer tipo de método ya que los mecanismos de defensa contra las enfermedades parasitarias incluyen, en muchos casos, barreras físicas y químicas a la penetración (cfr. punto 1.3.3.3.6; ítem 2a.1). Las mencionadas barreras se verían sin duda eliminadas o alteradas con el empleo de métodos de inoculación tan drásticos. Por otro lado, se quería evitar las alteraciones metabólicas propias del daño celular que es producido al efectuar una herida artificial (Uritani, 1976).

El ensayo que se presenta a continuación tuvo como objetivo comparar dos tipos de inóculo: a) inoculación con esclerocios (fuente de inóculo natural) y b) inoculación con granos de arroz previamente infectados con el patógeno (confrontar 11.2.3.1.). Se quiso conocer la existencia o no de diferencias en la eficiencia, grado de ataque, y en la velocidad del crecimiento fúngico en el interior del hospedante, de acuerdo con el tipo de inóculo.

El estudio se llevó a cabo con plantas de una línea isogénica en estadio vegetativo, que se inocularon artificialmente con los dos tipos de inóculo. Los distintos parámetros se evaluaron al 5º día de la inoculación.

No se hallaron diferencias significativas entre los promedios de las longitudes de las lesiones, ni entre los porcentajes de hojas con marchitez permanente. El índice de marchitez de síntomas, y el porcentaje de plantas muertas fue similar para ambos tratamientos. Asimismo, en ambos casos se obtuvo un 100% de infección. Esto indicaría la no existencia de barreras a la penetración (Tabla VIII).

La velocidad del crecimiento fúngico en el interior del hospedante no difirió entre los tratamientos, considerando que no se encontraron diferencias significativas entre los promedios de las longitudes de las lesiones para ninguno de los días relevados (Figura 8).

A través de todos los resultados obtenidos es posible concluir que no existen diferencias a nivel de síntomas, entre los tipos de inoculación ensayados.

La inoculación con esclerocios constituye sin duda un método más natural. Sin embargo, su estandarización implicaría contar con esclerocios de igual origen, edad y tamaño (factor muy variable) en el momento de la

Tabla VIII: Evaluación de la susceptibilidad de una línea isogénica en estadio vegetativo frente a la inoculación con esclerocios (E) y con granos de arroz infectados (A), al 5º día de la inoculación.

	Inóculos	
	A	E
% plantas enfermas	100	100
% plantas muertas	14	0
I.M.*	2,3	2,4
Longitud media de lesiones (cm)	2,0 ^a	1,8 ^a
% medio de hojas con marchitez permanente	7,1 ^a	2,0 ^a

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas. La comparación es válida dentro de cada fila. Los valores con promedio de 15 repeticiones. * Índice de marchitez (11.2:4).

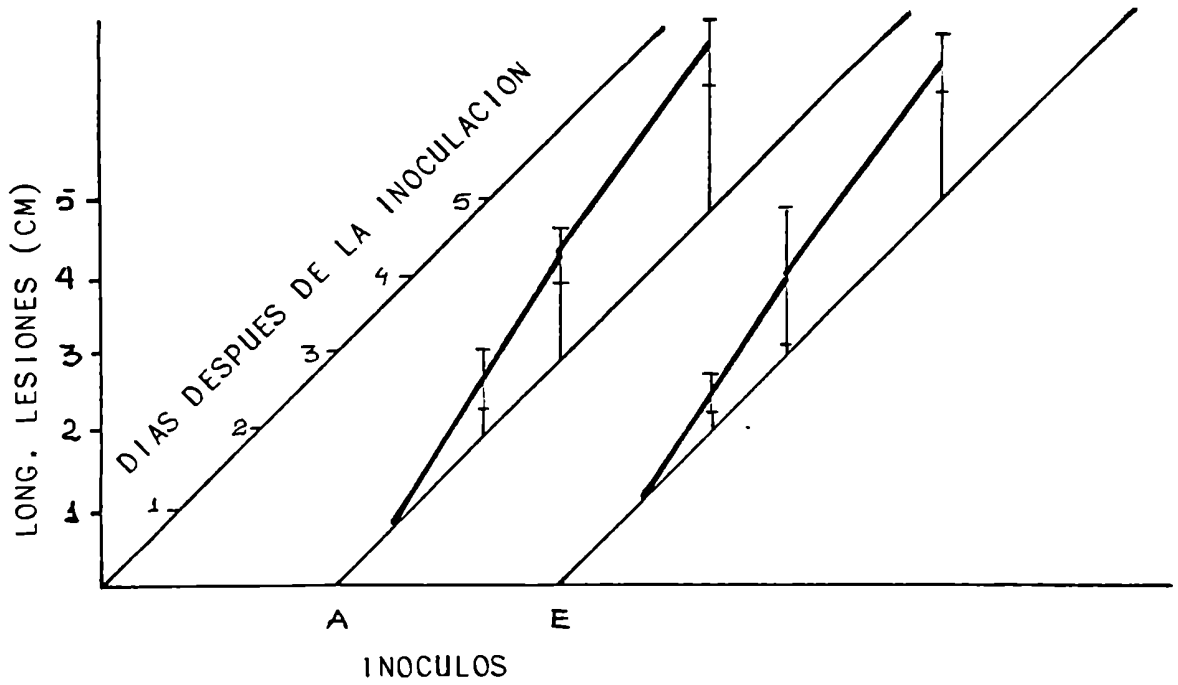


Figura 8: Efecto del método de inoculación sobre la susceptibilidad. Longitud de las lesiones en función del tiempo. A: inoculación con arroz; E: inoculación con esclerocios. Los valores son promedio de 15 repeticiones.

realización de cada ensayo, lo cual es virtualmente imposible.

Dado que su estandarización es más sencilla y precisa, se seleccionó el método del grano de arroz para todos los ensayos realizados posteriormente.

III.1.3. Zonas de inoculación

Los niveles de resistencia a las enfermedades parasitarias para una edad determinada, varían entre órganos y tejidos de una misma planta (Bell, 1981). Es por eso que la determinación exacta de la zona de inoculación se hace indispensable para el estudio de las interacciones hospedante-patógeno.

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos, algunos de los autores que estudiaron la podredumbre basal no consideraron este aspecto. Las inoculaciones se realizaban en "la base del tallo, sobre la superficie del suelo" (Putt, 1958; Auger y Nome, 1970; y Dueck y Campbell, 1978). Por lo contrario, en otros casos existió una mayor atención sobre este punto: "en la base o parte inferior del hipocótilo, sobre la superficie del suelo" (Orellana, 1975; Noyes y Hancock, 1981). En cuanto a las inoculaciones artificiales realizadas para el logro del mejoramiento genético frente a esta enfermedad en la Argentina, se realizan en la base del tallo sobre la superficie del suelo pero sin tener en cuenta su exacta localización (Teyssandier, com. pers.).

De acuerdo con el manejo de nuestro material, el hipocótilo quedaba total o parcialmente enterrado. Es por eso que se decidió estandarizar como zona de inoculación a la base del epicótilo, a nivel de la superficie del suelo. Ciertas observaciones indicaron la importancia de la exacta ubicación del inóculo. En los casos en los que excepcionalmente el hipocótilo sobresalía de la superficie del suelo, y que por lo tanto se lo inoculó, no se observaron síntomas visibles al 5º día. Esto al parecer ocurría independientemente de la edad del huésped. Dichos individuos no fueron incluidos en los resultados.

Dado que los ensayos de selección de resistencia se llevan a cabo

sin tener en cuenta este factor, se consideró de fundamental importancia verificar si en las condiciones de campo la velocidad de ataque era diferente en plantas de una única edad, de acuerdo con la zona de inoculación.

Se evaluaron los resultados de un ensayo efectuado a campo por E. Teyssandier en la estación experimental de Cargill, en Pergamino (Pcia. de Bs.As.) (cfr. 11.2.3.2.) y cosechado en el mes de enero de 1984.

En el caso de la línea madre del híbrido Super 400 (LM), se encontraron grandes diferencias en el tipo de respuesta al patógeno según la zona de inoculación (Tabla IX). Las plantas inoculadas en el hipocótilo (H) fueron significativamente más tolerantes que las inoculadas en el epicótilo (E). Estas últimas presentaron lesiones más largas ($P: 0,05$). Además se encontró una dependencia altamente significativa de los síntomas "tallos huecos" ($P: 0,01$) y "lesiones claras" ($P: 0,01$), y la inoculación en esta zona. El hecho de que los tallos se presenten huecos es una manifestación de la llegada del patógeno a la médula de los mismos. Los tejidos en el E exhibirían, sin duda, una menor resistencia a ser penetrados por el hongo. En cuanto a la presencia de las lesiones "claras", como se determinará en el punto 111.4a. es un síntoma altamente característico de la susceptibilidad a este patógeno.

Los individuos de S_{400} fueron siempre susceptibles, independientemente de la zona en que se los inoculó. No se hallaron diferencias entre las longitudes de las lesiones, ni los porcentajes de individuos con tallos huecos y lesiones claras. Dichos valores fueron siempre muy elevados (Tabla IX). Estos resultados confirman la elevada susceptibilidad de este híbrido frente al patógeno.

Con respecto a la línea, los resultados coinciden con las observaciones preliminares. Efectivamente, para la LM se encontró una menor velocidad del desarrollo de la enfermedad cuando la inoculación se realizó en el H. Al parecer la tolerancia del H constituiría un carácter heredable que se enmascararía en el S_{400} . Es importante, finalmente, destacar que la no estandarización del sitio de inoculación puede llevar a resultados erróneos y no comparables.

Tabla IX: Evaluación de la susceptibilidad de una línea madre del híbrido Super 400 (LM) y de este híbrido (S 400), al ser inoculadas artificialmente en el hipocótilo (H) y epicótilo (E) (5° día después de la inoculación).

		LM	S 400	
	Longitud	media de lesiones (cm)	15,8 ^a	24,3 ^b
H	%	tallos huecos	20,0	86,0
	%	lesiones claras	10,0	95,0
	Longitud	media de lesiones (cm)	25,5 ^b	24,0 ^b
E	%	tallos huecos	65,0	85,0
	%	lesiones claras	70,0	85,0

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 5%. Las comparaciones son válidas dentro de las filas y columnas. Los valores son promedio de 20 repeticiones.

III.1.4 Efecto de la edad del huésped en la predisposición

III.1.4.1. Plantas cultivadas con 12 horas de luz

La selección de los estadios del girasol a inocular se basó en el único antecedente encontrado sobre este tema para esta enfermedad. Se trata de un estudio realizado por Auger y Nome (1970), en condiciones de campo e invernáculo. Dichos autores realizaron una curva de susceptibilidad comenzando con el estadio vegetativo (5 pares de hojas) como edad más joven y realizando sucesivas inoculaciones cada 8 días a partir de la primera fecha de inoculación. Con tal criterio, en este ensayo se estudiaron 4 estadios sucesivos que correspondieron a: 1) vegetativo, 2) botón floral cerrado (visible), 3) botón floral y 4) botón floral abierto. Las plantas en cada estadio presentaron las características resumidas en la Tabla IV. Luego de la inoculación por medio del método seleccionado en el punto III.2b, la susceptibilidad fue evaluada hasta el 5º día de la inoculación momento en el que comenzaba a producirse la muerte de las plantas (II.2.4.g.), mediante los parámetros descritos en II.2.4. Como el objetivo más amplio al cual se dirigían estos estudios era el análisis de los componentes de la defensa (a través de las diferencias entre individuos tolerantes y susceptibles), si se retrasaba la cosecha más allá de la aparición de dichos síntomas, las plantas que los exhibían podrían sufrir alteraciones metabólicas no relacionadas con la defensa que llevaran a conclusiones erróneas. Por ejemplo en numerosos casos una vez que las plantas tolerantes han sintetizado compuestos antifúngicos por encima de niveles que frenan el desarrollo patogénico, su producción cesa. Por el contrario las plantas susceptibles sintetizan los mismos compuestos pero más lentamente y no alcanzan los niveles inhibitorios a tiempo para frenar la enfermedad. Sin embargo la producción puede continuar a pesar de que el hospedante haya sido colonizado. Esto podría traer como consecuencia que, de realizarse tardíamente los análisis, no se detectaran diferencias en las concentraciones de compuestos antifúngicos llevando a su subestimación como componentes de la defensa (Bell, 1981).

Como se observa en la Tabla X, el 100% de las plantas inoculadas de

los 4 estadios presentaron síntomas al 5º día después de la inoculación. Esto indicó la ausencia de barreras externas a la penetración que impidieron el paso del patógeno hacia el interior del hospedante. Tampoco varió entre edades la velocidad de aparición de las lesiones, ya que en todos los casos estas se hicieron visibles al 3º día después de la inoculación (Figura 9).

Con respecto a la velocidad de desarrollo de las lesiones, no se encontraron diferencias significativas entre los promedios de las longitudes de las mismas entre los estadios I, II y III ni al 4º ni al 5º día después de inocular. Por otro lado, los promedios de dichas longitudes en el estadio IV fue siempre significativamente menor que en los otros estadios ($P:0,01$) (Figura 9).

La aparición de la marchitez varió con la edad del hospedante (Figura 10). En los estadios II y III, esta apareció al 3º día (Figura 10) (I.M:0 indica ausencia de marchitez), en el I al 4º y en el IV al 5º. Además los mayores índices de marchitez (I.M.) se encontraron siempre en el estadio II, y los menores en el IV. Asimismo el mayor número de plantas con el 100% de hojas con marchitez permanente se halló en el estadio II en tanto que en el IV no se observaron individuos con este síntoma (Figura 10). En cuanto al porcentaje medio de hojas con MP por planta, fue elevado y similar en I y II, en tanto que fue menor y no difirió en III y IV (Tabla X). Con respecto al síntoma tallo hueco, nuevamente fue en el estadio II el que presentó el mayor número de individuos con este síntoma, con un 80% de individuos con tallos huecos. Lo siguió el estadio III, luego el I y por último el IV (Tabla X).

El estadio II presentó el mayor número de plantas muertas al día de la cosecha, en tanto que en el IV no se produjo mortandad (Tabla X).

Con el objeto de estudiar la dependencia entre las distintas características de las lesiones y la susceptibilidad se agruparon todos los individuos, independientemente de su edad, en dos grandes clases: "susceptibles" (plantas que presentaron los grados 2, 3 y 4 de marchitez) y "tolerantes" (plantas que presentaron los grados 0 y 1) (cfr. 11.2.4.f.). Se encontró a través del empleo de un test de independencia, que las plantas susceptibles se caracterizaban por presentar lesiones claras, húmedas, con límites

Tabla X: Evaluación de la susceptibilidad de una línea isogénica, cultivadas con 12 hs de luz, en función de la edad de inoculación (5° día después de la inoculación).

	Estadios			
	I	II	III	IV
% plantas enfermas	100	100	100	100
% plantas muertas	25	40	12	0
Longitud media de lesiones (cm)	3,5 ^a	4,6 ^a	4,0 ^a	0,8 ^b
I.M.*	2,0	2,8	1,5	0,4
% plantas con tallos huecos	38	80	62	0
% medio de hojas con marchitez permanente	37 ^a	40 ^a	12,5 ^b	0 ^b

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 5%. Valores son promedio de 8 repeticiones.

I: estadio vegetativo; II: botón floral cerrado; III: botón; IV: botón floral abierto.

*: Índice de marchitez (11.2.4).

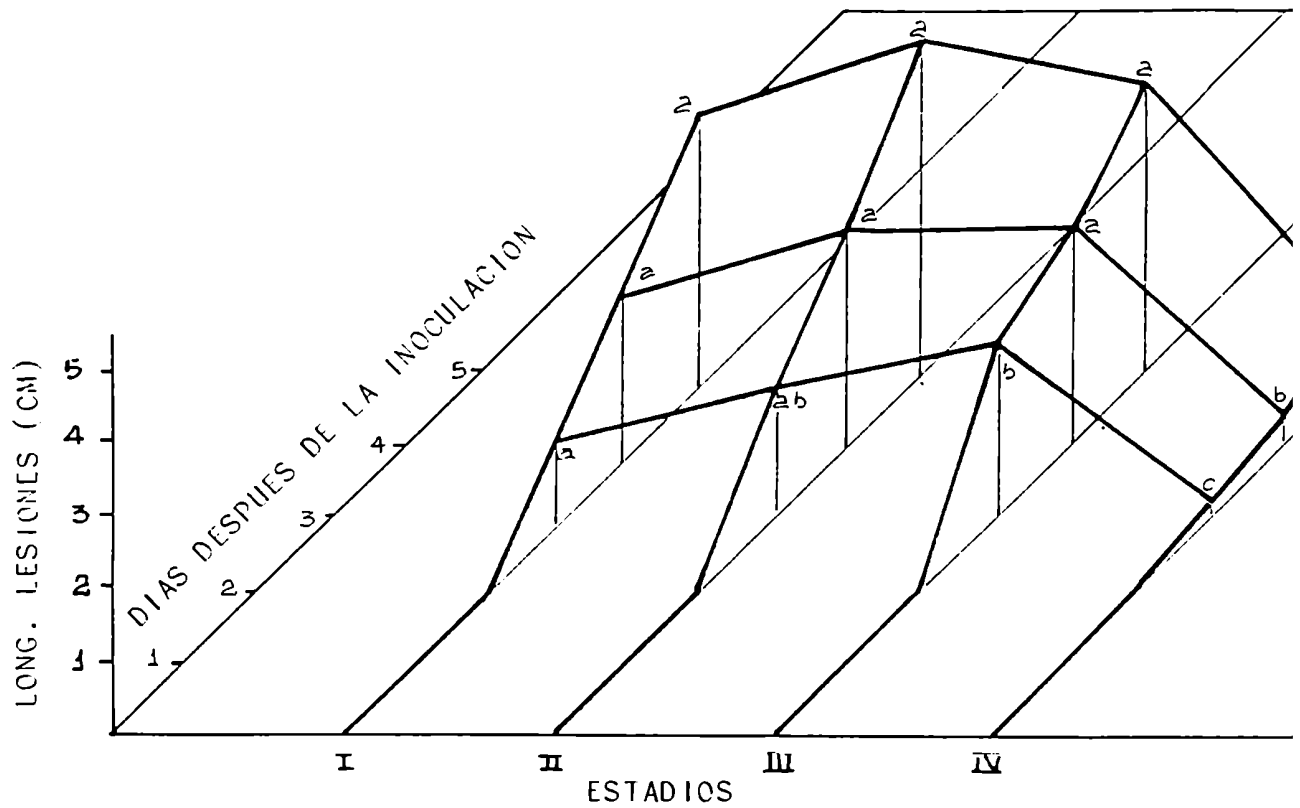


Figura 9: Plantas cultivadas con 12 hs de luz. Longitud de las lesiones en función del tiempo, de acuerdo con la edad de inoculación. I: vegetativo; II: botón floral cerrado; III: botón floral; IV: botón floral abierto. Valores acompañados por letras distintas indican diferencias significativas. Las comparaciones solo son válidas dentro de cada día. Los valores son promedio de 8 repeticiones.

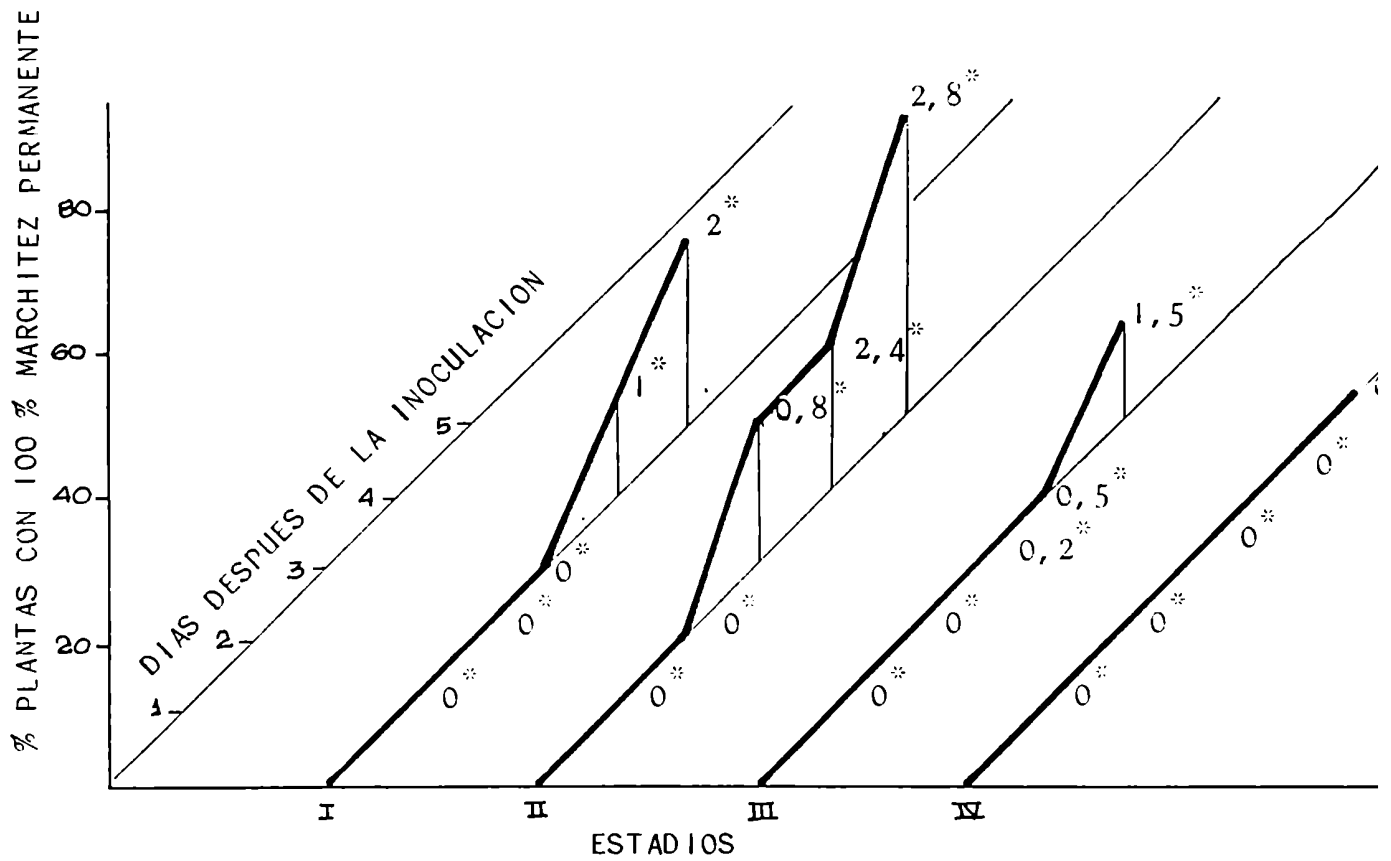


Figura 10: Plantas cultivadas con 12 hs de luz. Porcentajes de individuos con 100% de hojas con marchitez permanente, de acuerdo con la edad de inoculación. I: vegetativo; II: botón floral cerrado; III: botón floral; IV: botón floral abierto; *: índice de marchitez (0: 100% de individuos no marchitos- 4: 100% de individuos con 51-100% de hojas con marchitez permanente). Total de individuos por tratamiento: 8.

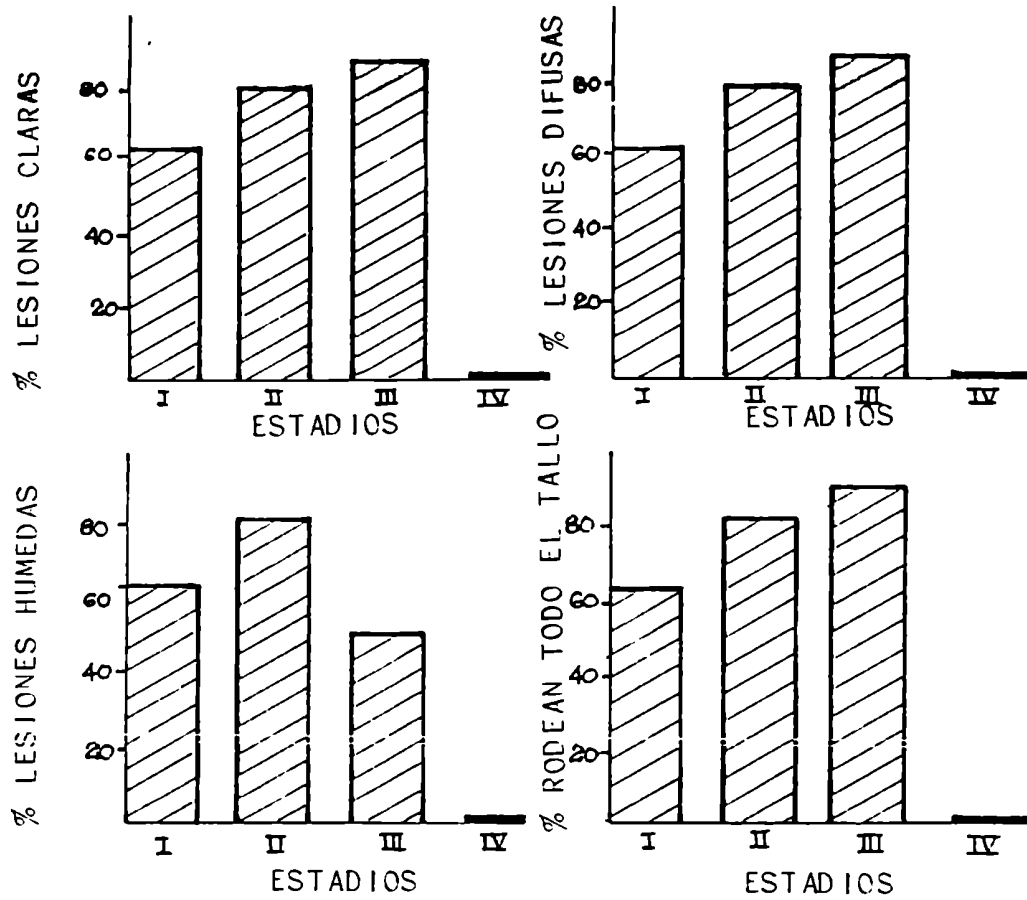


Figura 11: Plantas cultivadas con 12 hs de luz. Porcentajes de individuos con síntomas característicos de la susceptibilidad, de acuerdo con la edad de inoculación. I: vegetativo, II: botón floral cerrado; III: botón floral; IV: botón floral abierto. Total de individuos por tratamiento: 8.

difusos, y que rodeaban la totalidad del tallo ($P:0,01$). Por el contrario, las lesiones de las plantas tolerantes se caracterizaron por ser oscuras (en especial en sus bordes), de bordes limitados, secas y que no rodeaban todo el tallo. En la Figura 11 se presenta el % de plantas con los síntomas característicos de la susceptibilidad para cada estadio de crecimiento. Este es sumamente alto para los estadios I, II y III (siempre mayores del 50%), y nulo para la edad IV.

Del análisis combinado de las Figuras 9, 10 y 11 y de la Tabla X, es posible concluir que los estadios I, II y III fueron altamente susceptibles al patógeno, con un máximo en el estadio II. Por el contrario, el estadio IV se comportó como tolerante.

III.1.4.2. Plantas cultivadas con 16 horas de luz

Dada la gran susceptibilidad observada en el experimento anterior se decidió realizar nuevas curvas de susceptibilidad empleando un período luminoso mayor. Tal decisión se basó en los resultados obtenidos por Orellana (1975). El mencionado autor encontró que la susceptibilidad del girasol disminuye al aumentar el número de horas del período luminoso. Debido a que el comportamiento de los estadios I y III fue muy semejante se decidió continuar el estudio únicamente con los estadios I, II y IV.

Al igual que en el ensayo anterior, no varió el porcentaje de plantas enfermas al 5º día entre estadios, y se acercó en todos los casos al 100% (Tabla XI). Tampoco se encontraron diferencias en la velocidad de aparición de las lesiones ya que estas se hicieron visibles al 3º día en los tres estadios (Figura 12).

A diferencia de lo ocurrido con 12 horas de luz, el promedio de las longitudes de las lesiones en el estadio IV no difirió significativamente del de los otros estadios en ninguno de los días estudiados (Figura 12). Esto se debe a un aumento en la tolerancia en los estadios I y II, respecto a la observada con el menor régimen luminoso, el que se manifiesta a través de lesiones más pequeñas.

La marchitez se hizo visible en el estadio II al 4º día, y en el I y IV al 5º. Al igual que en el ensayo anterior los mayores I.M se encontraron

Tabla XI: Evaluación de la susceptibilidad de una línea isogénica de girasol, cultivada con 16 hs de luz, en función de la edad de inoculación (5° día después de la inoculación)

	Estadios		
	I	II	IV
% plantas enfermas	95 ^a	100 ^a	94 ^a
% plantas muertas	0 ^a	31 ^b	0 ^{a*}
longitud media de lesiones (cm)	1,3 ^a	2,9 ^a	1,9 ^a
I.M.+	0,5 ^a	1,6 ^b	0,04 ^{a**}
% plantas con tallos huecos	0 ^a	28 ^b	0 ^a
% medio de hojas con marchitez permanente	0 ^a	30,3 ^b	0 ^a

Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas al * 1% y al ** 5%, respectivamente. La comparación es solo válida dentro de cada fila. Los valores son promedio de 3 ensayos completos.

I: estadio vegetativo; II: de botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.
+ I.M.: índice de marchitez (11.2.4).

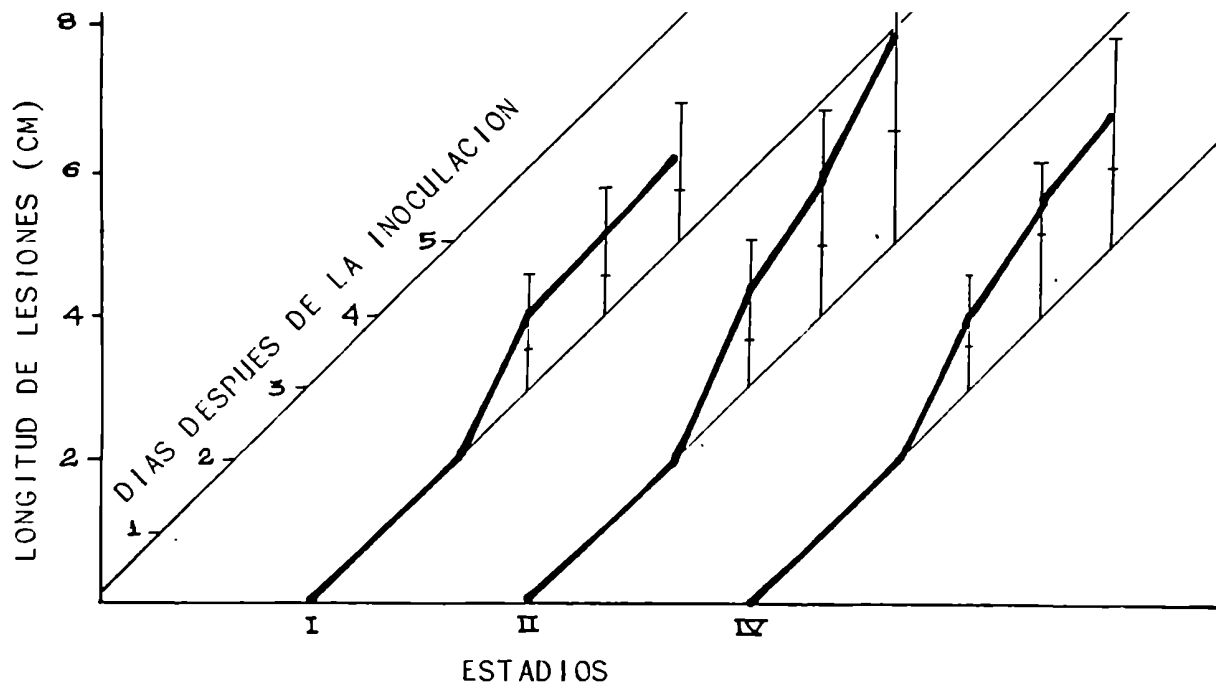


Figura 12: Plantas cultivadas con 16 hs. de luz. Longitud de las lesiones en función del tiempo, de acuerdo con la edad de inoculación. I: vegetativo; II: botón floral cerrado; IV: botón floral abierto. Los valores son promedio de 8 repeticiones.

en el estadio II y los menores en el IV. Lo mismo ocurrió con el porcentaje de plantas con marchitez permanente. Individuos con tallos huecos solo se encontraron en el estadio II (Tabla XI). Los resultados fueron semejantes para el síntoma de planta 'muerta'. En coincidencia con los resultados obtenidos para las plantas crecidas con 12 horas de luz, la susceptibilidad se caracterizó por la presencia de lesiones claras, húmedas y de bordes difusos ($P:0,01$). Por el contrario el carácter "rodea todo el tallo" fue independiente del grado de tolerancia. El estadio II presentó los mayores porcentajes de individuos con los síntomas característicos de la susceptibilidad (Figura 13).

Como es posible concluir a través de los resultados expuestos, el estadio II presentó nuevamente la máxima susceptibilidad, si bien comparativamente ella fue menor cuando se lo cultivó con 16 hs de luz. En general existió una mayor tolerancia para todas las edades cultivadas con un fotoperíodo más largo, hecho que concuerda con lo observado por Orellana (1975).

Del análisis conjunto de los experimentos III.1.4.1.y 2 surge como conclusión general que el estadio de botón floral cerrado es el más susceptible y que el de botón floral abierto se mantiene siempre como tolerante. Sobresale el hecho de que en las plantas más jóvenes, de tallos más delgados y menos lignificados la respuesta varía de moderadamente susceptible a tolerante si se incrementan las horas de luz.

En la Figura 14 se ha representado, en forma comparativa, la evaluación de la susceptibilidad realizada por Auger y Nome (1970) y la que resultó del presente estudio. Como los mencionados autores unicamente evaluaron el número de plantas muertas, solo se compara dicho parámetro. Cabe señalar además que dadas las obvias diferencias entre el crecimiento a campo e invernáculo, y en cámara bioclimática, el día de la evaluación es diferente. Sin embargo, dejando de lado los valores absolutos se encuentran coincidencias en los resultados para los estadios estudiados. Efectivamente, como se desprende del gráfico, para la porción de la curva evaluada, el estadio II presentó, en todos los casos, la máxima susceptibilidad.

Dentro de los límites del presente estudio podríamos considerar que el patrón de la variabilidad de la susceptibilidad de acuerdo con la edad entraría dentro del que Yarwood (1959) denomina: "resistencia juvenil y adulta, con susceptibilidad en el período intermedio". Sin embargo Auger

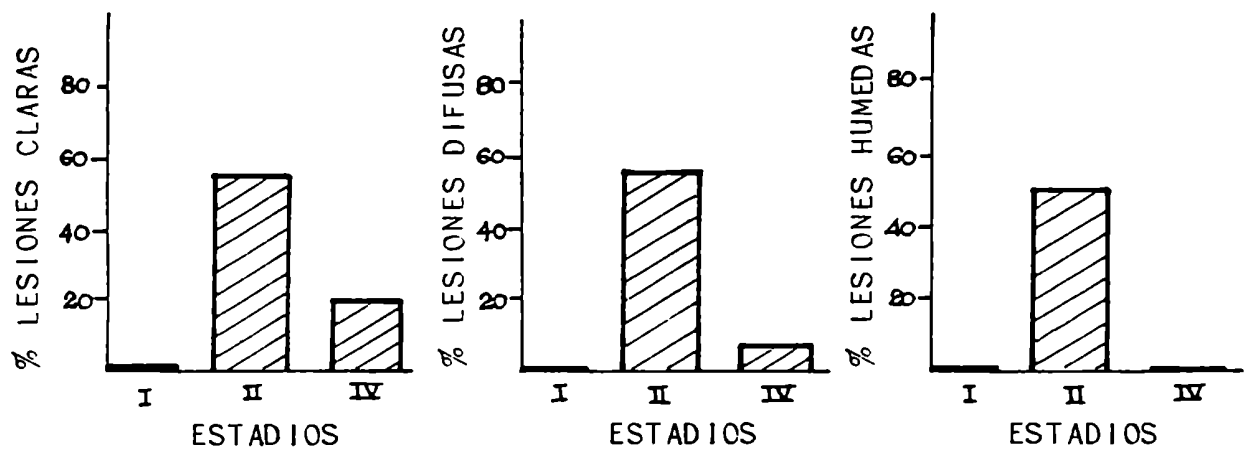


Figura 13: Plantas cultivadas con 16 hs de luz. Porcentajes de individuos con síntomas característicos de la susceptibilidad, de acuerdo con la edad de inoculación. I: vegetativo; II: botón floral cerrado; IV: botón floral abierto. Total de individuos por tratamiento: 8 .

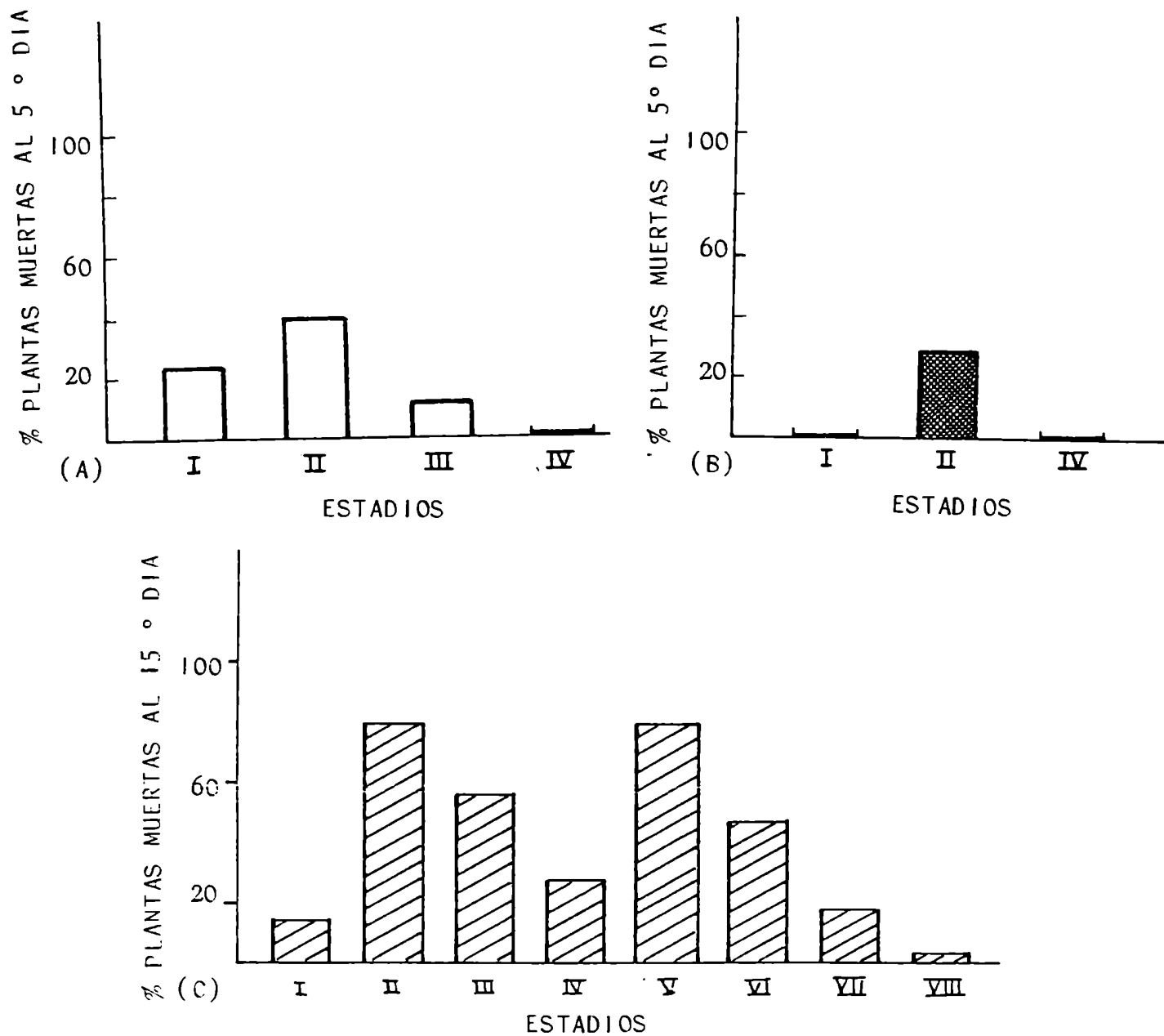


Figura 14: Efecto de la edad del hospedante en la predisposición a la podredumbre basal expresado a través del % de plantas muertas al 5° día (A y B) y al 15° día (C). A: plantas cultivadas en cámara, con 12 hs de luz; B: idem A, con 16 hs de luz y C: plantas cultivadas a campo (de Auger y Nome, 1970).

y Nome (op. cit.) demostraron que en estadios más adultos la susceptibilidad aumenta y vuelve a disminuir (cfr. Figura 14). En tal sentido sería más adecuado considerar el patrón propuesto por Bell (1980) que se refiere a "variaciones cíclicas de la defensa con la edad" (cfr. 1.3.3.3.8.1.).

En cuanto a las posibles causas de la variación de respuesta del girasol con la edad, Auger y Nome (1970) proponen que podría deberse a: el rápido crecimiento de las plantas en la etapa juvenil produce un debilitamiento de las paredes celulares, especialmente en la laminilla media, favoreciendo el aumento proporcional de las pectinas solubles en el tejido vegetal. El aumento de dichas pectinas en las plantas favorecería el ataque de las enzimas pectinolíticas producidas por Sclerotinia. Este fenómeno se vería favorecido también por la posible disminución del ion calcio en la composición del pectato de calcio, componente principal de la pared media de la célula. Esta disminución ocurriría por la multiplicación y crecimiento celular acelerado de la planta, desde su emergencia hasta el estado de prefloración en que este debilitamiento llega a su máximo". Otra posible interpretación que los mencionados autores sugieren "radicaría en el aumento del contenido de azúcares reductores y a los niveles fluctuantes de estos en la planta". Aceptando dicha hipótesis los autores piensan que en la primera etapa de desarrollo existiría una corriente descendente de azúcares reductores hacia la zona radical, caudal que aumentaría en relación al crecimiento de la planta. Cuando esta alcanza el estado de flor, posiblemente ocurriría un drenaje de estos hidratos de carbono hacia el capítulo, necesarios para la polinización, fecundación y desarrollo del grano. De ocurrir así, disminuiría la proporción de azúcares reductores en la zona del cuello, disminuyendo por lo tanto la susceptibilidad de la planta al ataque del patógeno.

Es importante señalar que tratamientos con reguladores de crecimiento y azúcares pueden afectar los cambios de susceptibilidad. Según Horsfall y Dimond (1959) y Bell (1980), un alto contenido de azúcares en la planta favorecería la acción de algunos patógenos y sería desfavorable para otros.

En cuanto al factor luz, según Bell (1980), es un hecho bastante generalizado que la baja intensidad lumínica, la oscuridad y los fotoperíodos cortos retarden el aumento en la tolerancia de tallo y raíces, y faciliten la pérdida de las defensas en las hojas. La luz continua o los fotoperíodos

largos poseen efectos opuestos, particularmente cuando ellos inhiben la floración. La remoción manual de los botones florales de plantas de algodón retrasa la pérdida de la defensa a la podredumbre radical producida por Phymatotrichum, y a la marchitez producida por Verticillium, enfermedades normalmente asociadas a la floración y producción de frutos (Bell, op. cit.). Si bien el efecto no sería similar en este caso ya que el girasol es considerada neutra desde el punto de vista fotoperiódico (Vrânceanu, 1977), es interesante señalar que la remoción manual de los botones del girasol lleva a la disminución de la susceptibilidad en dicho estadio (Teyssandier, com. personal).

Un aspecto que se mantuvo estable a pesar de la variación del factor fotoperiódico fue la caracterización del tipo de lesiones susceptible y tolerante. S. sclerotiorum es un hongo que se caracteriza por poseer un sistema enzimático complejo (cfr. punto 1.3.3.3.4 y 1.3.3.3.5). La acción de las enzimas sumada al efecto sinérgico del ácido oxálico, fuerte quelante del Na y Ca que extrae dichos cationes de los pectatos insolubles, trae como consecuencia la muerte celular. Asimismo, la pérdida de la permeabilidad celular provocaría una fuerte exósmosis la que se manifestaría a través del síntoma lesiones "húmedas" (Thatcher, 1939). Por otro lado, las lesiones "claras" estarían dadas por la ausencia o menor producción de pigmentos melanínicos. Por lo general se encuentra que la presencia de dichos polímeros limita las lesiones. Lumsden (1979), en un estudio comparado entre Phaseolus coccineus (tolerante a S. sclerotiorum) y P. vulgaris (susceptible), encontró que la tolerancia se caracterizaba por presentar lesiones pequeñas, limitadas y castañas. Estos resultados muestran una estrecha coincidencia con lo que ocurre en girasol.

El mayor grado de marchitez en el estadio más susceptible podría deberse a varios factores. Uno sería el taponamiento mecánico de los vasos por medio de hifas y de cristales de oxalato de Ca (Pawloski y Grogan, 1964), como consecuencia del arribo del hongo al sistema vascular. Otro, la acumulación en las hojas, por encima de umbrales críticos, del ácido oxálico (Noyes y Hancock, op. cit.) (cfr punto 1.3.3.3.5). Dicho compuesto actúa como una toxina móvil que se transporta vía flujo xilemático. En las plantas susceptibles esto podría deberse a una mayor producción de toxina como consecuencia de una mayor masa del patógeno y/o diferente velocidad de transporte de

ella respecto a lo que ocurre en las plantas tolerantes, y/o diferencias en sensibilidad al ácido oxálico. En los individuos altamente susceptibles el hongo alcanza la médula, es decir que libera su toxina directamente en el sistema vascular. Por el contrario, en los individuos tolerantes las lesiones son muy superficiales y la toxina deberá difundir hasta el xilema para ser luego transportada por el flujo xilemático.

Otra característica interesante que se observó es que el hongo no crece, o lo hace muy lentamente, hacia la raíz. Sin embargo esto parecería ser independiente de la edad del hospedante.

El único parámetro que en el ensayo realizado con el fotoperíodo mayor parecía a priori, no guardar relación con la susceptibilidad fue la longitud de las lesiones. Esto se debía al hecho que el promedio de las longitudes de las lesiones en el estadio más susceptible (II) no difería significativamente, en ningún momento hasta el día de la cosecha, del correspondiente a los otros estadios (cfr. Figura 12). Sin embargo la observación que en el estadio II los individuos presentaban caracteres tolerantes o severamente susceptibles, hizo pensar en la existencia de dos subpoblaciones de individuo, cuyas diferencias en respuesta a la enfermedad se expresaran en este estadio. Efectivamente, al estudiar la distribución de las frecuencias de individuos con los distintos grados de marchitez, establecidos para el cálculo de los índices de marchitez, se encontró una distribución bimodal de las mismas (Figura 15). Lo mismo ocurrió cuando se representó gráficamente la variable longitud de las lesiones en relación a el grado de marchitez de cada individuo (Figura 16). Los individuos del estadio II fueron entonces separados en dos grupos: susceptible (II_S) y tolerante (II_T), ubicando en el primer grupo a aquellos que presentaban grados de marchitez 2, 3 y 4. En la Figura 17 se ha representado el desarrollo de las lesiones en función de los días después de la inoculación, para los nuevos grupos establecidos. Como puede observarse, en este caso el mencionado parámetro se relaciona con la susceptibilidad, ya que el estadio II_S presentó lesiones significativamente más largas al 4° y 5° día.

El hecho que las plantas crecieron bajo condiciones de cultivo uniformes, que fueron rotadas dentro de la cámara de cultivo, e inoculadas al azar

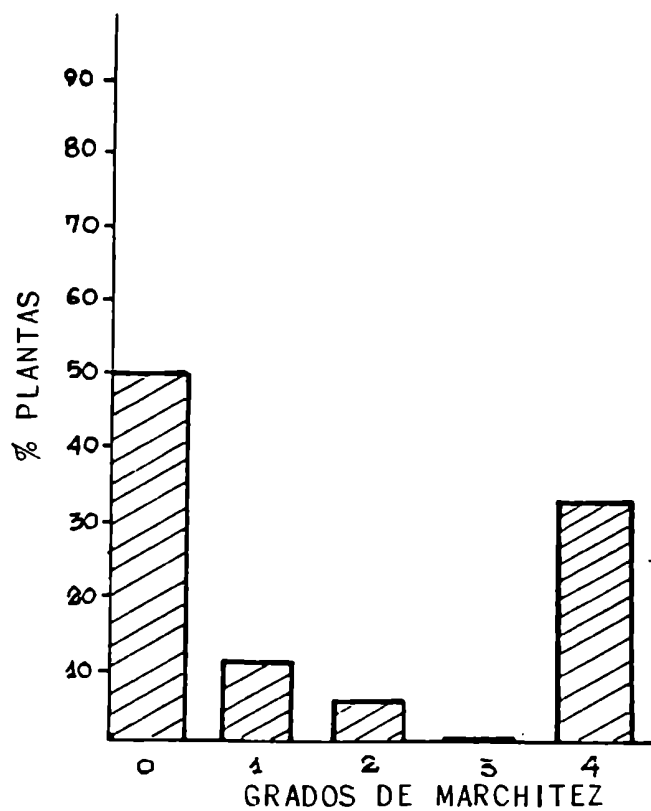


Figura 15: Plantas cultivadas con 16 hs de luz. Distribución de frecuencias de grados de marchitez, dentro del estadio de máxima susceptibilidad (II: botón floral cerrado). Total de individuos: 18. Grado 0: individuos sin hojas marchitas; 1: individuos con 1-50% de hojas con marchitez incipiente; 2: individuos con 51-100% de hojas con marchitez incipiente; 3: individuos con 1-50% de hojas con marchitez permanente y 4: individuos con 51-100% de hojas con marchitez permanente.

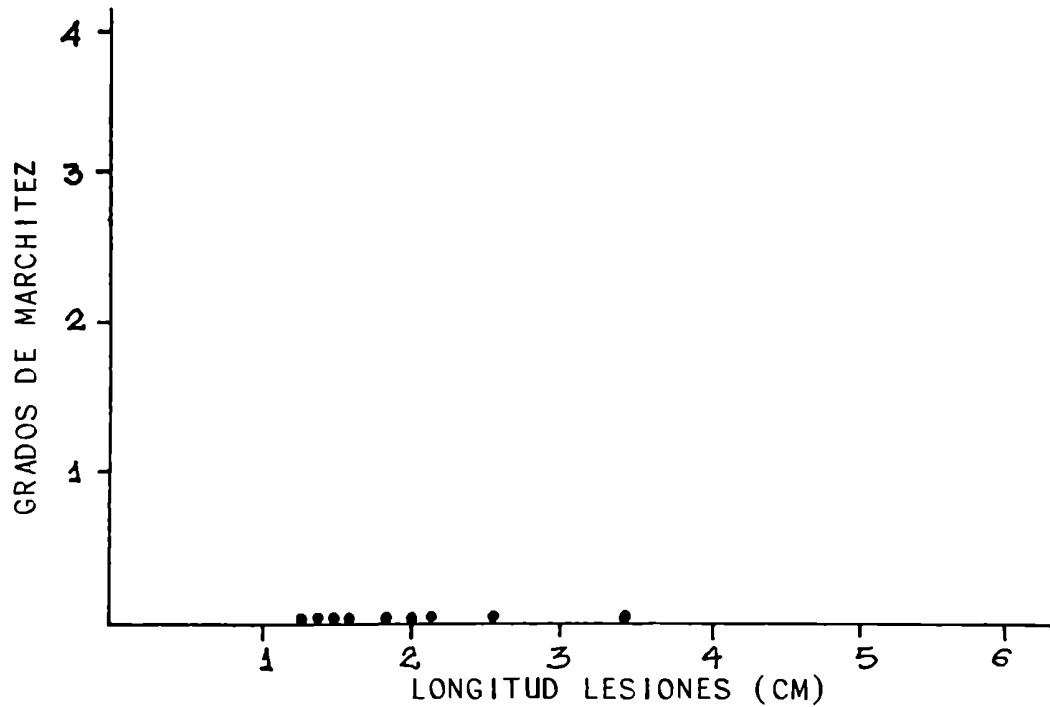


Figura 16: Plantas cultivadas con 16 hs de luz. Longitud de las lesiones en función del grado de marchitez para cada individuo del estadio II (botón floral cerrado: máxima susceptibilidad). 0: individuos sin hojas marchitas; 1: individuos con 1-50% de hojas con marchitez incipiente; 2: individuos con 51-100% de hojas con marchitez incipiente; 3: individuos con 1-50% de hojas con marchitez permanente y 4: individuos con 51-100% de hojas con marchitez permanente.

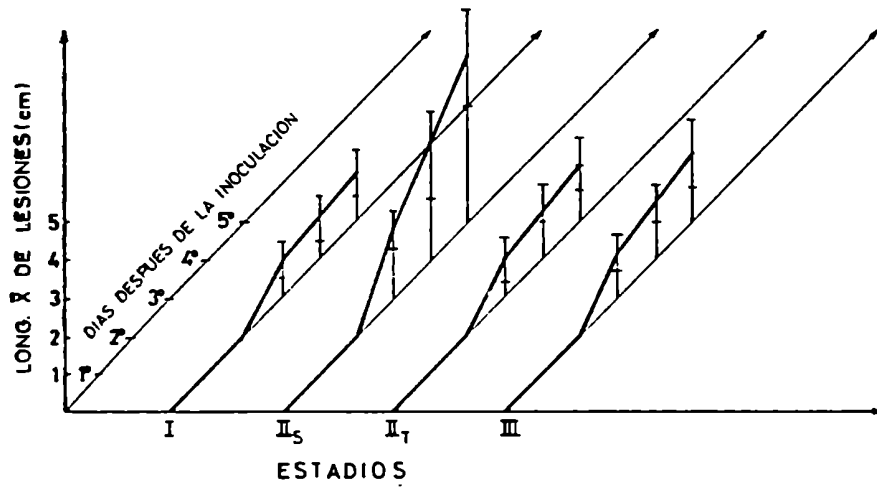


Figura 17: Plantas cultivadas con 16 hs de luz. Longitud de lesiones en función del tiempo, de acuerdo con la edad de inoculación. Los individuos del estadio II (máxima susceptibilidad) han sido separados en dos subgrupos: uno susceptible (II_S), y uno tolerante (II_T). I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

estaría indicando la existencia de una variabilidad genotípica para la susceptibilidad. La existencia de la misma, expresada aún en una línea altamente homocigota como la empleada, sería sin duda de importancia para la búsqueda de la resistencia genética a esta enfermedad.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto el efecto del factor edad como predisponente del girasol a la podredumbre basal. A su vez, los cambios en la defensa con la edad del huésped se vieron afectados por factores genotípicos y ambiental (al menos en lo que se refiere a la duración del período luminoso). Bell (1980) destaca la importancia de los mencionados factores como modificadores del efecto edad de la planta en la predisposición. De esta manera, en los casos en que el patrón de variabilidad aumenta en relación con la edad del huésped, dicho cambio es más rápido en cultivares de alfalfa resistentes a la podredumbre radical (Phytophthora), en cultivares de acelga resistentes al virus del enrollado, en tomate frente a los canchales bacterianos, y en plántulas de poroto frente a la antracnosis. En los casos en los que la defensa disminuye con la edad, esto puede producirse más lentamente o no hacerlo en los cultivares resistentes comparado con los susceptibles. Esto ocurre entre otros en papa frente al tizón (Phytophthora), o a la marchitez (Verticillium); en tomate atacado por el tizón; y algodón frente a la marchitez. Los cultivares resistentes muestran frecuentemente una madurez más tardía o hábitos de crecimiento indeterminados que pueden ser asociados con los cambios mencionados.

III.2. Estudios preliminares para la detección de componentes de la defensa involucrados en cambios de tolerancia a lo largo del ciclo de vida del hospedante.

III.2.1. Introducción

Los resultados de los ensayos descritos en el punto III.1. demostraron la existencia de un efecto de la edad en la predisposición del girasol a la podredumbre basal. Una vez establecidos los estadios susceptibles y tolerantes del hospedante interesó conocer cuáles eran los componentes de la defensa que estaban involucrados en dichos cambios.

En tal sentido, Bell (1980) propone diversas alternativas generales a través de las cuales, se podrían explicar las diferencias en la defensa a lo largo del ciclo ontogénico del hospedante.

a- Cambios en el contenido de nutrientes orgánicos.

Los azúcares, el almidón, los lípidos, aminoácidos y proteínas de reserva son importantes para las respuestas postinfeccionales de defensa del hospedante así como para el crecimiento del patógeno y la colonización de los tejidos vegetales.

b- Cambios en la vulnerabilidad a las fitotoxinas

Los organismos patogénicos producen tanto metabolitos secundarios como enzimas hidrolíticas, que son tóxicas para los tejidos del hospedante. La sensibilidad de dichos tejidos a los mismos puede cambiar con la edad.

c- Cambios en la producción de fitotoxinas.

Es posible que varíe la producción de toxinas por el patógeno ya que la misma puede ser inducida o reprimida por los diversos componentes presentes en los tejidos de hospedante.

d- Cambios en las barreras morfológicas

La diferenciación de células con paredes secundarias podría delimitar físicamente el crecimiento fúngico, especialmente cuando dentro de las mismas se localizan inhibidores enzimáticos. En algodón, el grosor de la cutícula y el contenido de ceras y ácidos cutínicos son mayores en las edades intermedias de las cápsulas, las cuales exhiben los mayores niveles de tolerancia a los hongos productores de podredumbres capsulares (Bell, 1980). Asimismo, en Eucalyptus bicostata la mayor resistencia que presentan las hojas jóvenes al hongo Phaeoseptoria se debería, aparentemente, a una doble capa de ceras sobre la cutícula (Royle, 1976).

e- Cambios en las barreras químicas

Antibióticos presentes en las células vegetales y en las paredes pueden inhibir la colonización de los tejidos del hospedante, a través de la inhibición del crecimiento y la reproducción del patógeno en su interior. En consecuencia, los cambios en la concentración de dichos compuestos alterarán la defensa de la planta.

f- Cambios en la velocidad del desarrollo de la defensa postinfeccional.

Luego de la inoculación con un patógeno, la planta puede producir estructuras anatómicas tales como tilosis, papilas, etc, y un incremento en los antibióticos preinfeccionales o la síntesis de novo de compuestos antifúngicos (fitoalexinas). El momento del desencadenamiento, la velocidad de producción y la duración de las mencionadas respuestas al ataque estarán muy relacionadas con su efectividad. Dichos parámetros de la defensa estarán, al menos, parcialmente relacionados con el vigor de la célula y su reserva.

A fin de contar con un panorama global sobre este tema, se lo encaró desde diversos ángulos. Las distintas alternativas propuestas por Bell se consideraron como hipótesis de trabajo. Asimismo se intentó aportar evidencias que apoyaran o no las sugerencias de Auger y Nome (op. cit.). (cfr Discusión final del punto III.1. Ciertos aspectos se refirieron al estado nutricional

de la planta sana como predisponente a la enfermedad (punto III.2.2) otros al eventual cambio de vulnerabilidad de los tejidos a las enzimas pectinolíticas del hongo (punto III.2.3) y finalmente una tercer línea de investigación se dedicó al estudio de los mecanismos de defensa tanto químicos (III.2.4 y III.3.) V) como físicos (III.4.) a lo largo del ciclo ontogénico de la planta.

III.2.2. Cambios en el contenido de nutrientes orgánicos

III.2.2.1. Cambios en el contenido de azúcares solubles totales

Con el propósito de conocer la eventual relación entre el contenido de azúcares solubles en el hospedante y su grado de tolerancia a la enfermedad, se los cuantificó en los tallos sanos y enfermos de las tres edades en estudio, siguiendo el método descrito en el punto III.2.5.1.1. Las plantas habían crecido bajo un fotoperíodo de 16 horas.

Como puede observarse en la Tabla XII, el contenido de azúcares solubles en la zona basal de los tallos varió con la edad de la planta. Fue significativamente menor ($P:0,01$) en el estadio más susceptible (II), en tanto que no difirió en los tolerantes (I y IV). Con respecto al contenido postinfeccional, no se encontraron diferencias sustanciales entre las plantas control e inoculadas, tanto en el estadio II como en el IV, aunque en este último se observó una tendencia a la disminución postinfeccional.

Numerosos autores demostraron la existencia de una relación entre la disminución de los azúcares y la disminución de la tolerancia a las enfermedades parasitarias en los distintos estadios de los hospedantes (Fajemisin y Hooker, 1974; Lukens, 1970; Muse, 1974; Robinson y Hodges, 1977; Vidyasekaran, 1974, etc). En estos casos un mayor contenido en carbohidratos sería más importante para la producción de antibióticos por la planta que para la colonización por el patógeno. Lukens (1970) y Vidyasekaran (1974) han sugerido que un mayor tenor de azúcares se relacionaría con la supresión de la síntesis de pectinasas por los patógenos. Byrde (en Okasha et al. 1968), expresa que un incremento en la concentración de glucosa inhibiría la biosíntesis de las enzimas adaptativas de algunos patógenos. En lo que se refiere a S. sclerotiorum, Lumsden (1976) encontró que la enzima endo PG es una enzima adaptativa

Tabla XII: Contenido de azúcares solubles totales en la zona basal de tallos sanos y en inoculados (zona de interacción), de distintas edades (mg/gr de peso seco).

	I	Estadios II	IV
Control	395,5 ^a	102,3 ^b	348,0 ^a
Inoculado		110,7 ^b	253,0 ^{ab}

Los valores son promedio de 3-4 repeticiones (cada una proveniente del agrupamiento de 6-12 individuos). Letras diferentes indican diferencias significativas al 1%. I: estadio vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto. -: dato faltante.

y que su producción es fuertemente inhibida por el agregado de glucosa al medio de cultivo. Este hecho sugiere la hipótesis de la inhibición de la actividad de esta enzima por una mayor concentración de los carbohidratos solubles en las plantas de las edades más tolerantes (I y IV).

La enzima endo PG cumple una función muy importante en la patogénesis en la podredumbre basal, estando asociada con los márgenes de avance de las lesiones jóvenes. En consecuencia, es esencial para el avance exitoso del patógeno durante los estadios tempranos de la colonización. La capacidad para producir grandes cantidades de esta enzima ha sido asociada con los aislamientos más virulentos de S. sclerotiorum sobre poroto. La endo PG es producida por las hifas de infección y cumple un papel importante en la colonización al contribuir en la lisis de las laminillas medias de las células del hospedante. Esto posibilita al patógeno un rápido avance intercelular (Cfr. 1.3.3.3.4 y 1.3.3.3.5).

De ser cierta esta idea, el hospedante estaría determinando una menor velocidad del desarrollo fúngico en las etapas tempranas de la colonización, lo cual le conferiría un mayor tiempo para el desarrollo de barreras postinfeccionales tanto físicas como químicas.

Lumsden (1969) encontró también que la actividad de las celulasas de S. sclerotiorum es frenada por la presencia de glucosa en el medio de cultivo. Esta enzima es producida bastante tempranamente en poroto infectado por el mencionado patógeno (al 2º día después de la inoculación) con lo cual, además de su rol nutricional, podría estar involucrada en la patogénesis. La inhibición de la actividad de esta enzima por parte de una concentración de azúcares más alta en los tallos de girasol de las edades tolerantes podría contribuir a una mayor tolerancia, ya que se relacionaría con un retardo en el crecimiento intracelular del hongo.

Como contraparte a la creación de un "ambiente desfavorable" para el parásito, el mayor contenido de azúcares solubles podría tener relación con la presencia de un "ambiente favorable" para la defensa por parte del hospedante.

Por ejemplo, Muse (1974) halló una relación inversa entre las concentraciones de dihidroxifenoles en el hospedante y la severidad del ataque de Helminthosporium. La concentración de fenoles fue positivamente correlacionada

con el contenido de azúcares, indicando que altos niveles de los mismos podrían favorecer la síntesis y acumulación de los fenoles inhibidores.

Por otro lado, Tena et al. (1984) encontraron que en hipocótilos de girasol, tanto enteros como en sus trozos la actividad de la fenilalanina amonioliasa (PAL) se ve marcadamente favorecida por el incremento de sacarosa en el medio de incubación. Es importante aclarar que la PAL es una enzima clave en la síntesis de fenoles. Cataliza la liberación de amonio desde la L-fenilalanina para dar ácido transcinámico (Figura 13). Esta reacción constituye, en las plantas, el paso inicial del camino de los fenilpropanoides en el cual el mencionado aminoácido es el precursor de derivados fenólicos tales como ligninas, flavonoides, etc. A su vez este aminoácido proviene del camino del ácido shiquímico que se inicia con la condensación de piruvato y eritrosa 4 fosfato (Figura 18) (Kosuga, 1969; Goodwin y Mercer, 1972). Sobre la base de estos antecedentes sería posible sugerir que un mayor contenido de azúcares proveería de sustratos para la síntesis de eventuales metabolitos fenólicos involucrados en la defensa (ver capítulo V) y, adicionalmente estimularía la actividad de una enzima clave en el camino biosintético de los mencionados compuestos.

Otro mecanismo a tener en cuenta respecto a la relación de los altos niveles de azúcares en la defensa, es su efecto como inhibidores de la detoxificación de fitoalexinas por algunos patógenos (Bell, 1980).

En cuanto a la fluctuación de azúcares solubles en las bases de los tallos de los distintos estadios, un exámen de los procesos que se suceden en cada caso podría aportar indicios sobre sus causas. El período del crecimiento del girasol comprendido entre la fase de 4-5 pares de hojas (correspondiente al estadio I) y hasta la de 7-8 pares de hojas (aproximadamente hasta el estadio II) es la etapa de diferenciación de los primordios del receptáculo, la cual termina poco antes de que el botón floral (capítulo rudimentario) sea visible (Vrânceanu, 1977). A partir de esta etapa comienza, según el mencionado autor la fase del crecimiento activo (Cfr. Tabla IV) en la cual la dinámica del crecimiento en altura del tallo y el desarrollo de la superficie foliar tienen su más alta tasa, alcanzando el máximo en las últimas dos semanas antes de la floración (aproximadamente el fin de esta fase coincidiría con el estadio IV). Sería factible que el menor contenido de azúcares solubles en la base de los tallos en el estadio II se deba a un mayor transporte de los mismos hacia el ápice donde tiene lugar una intensa actividad meristemática.

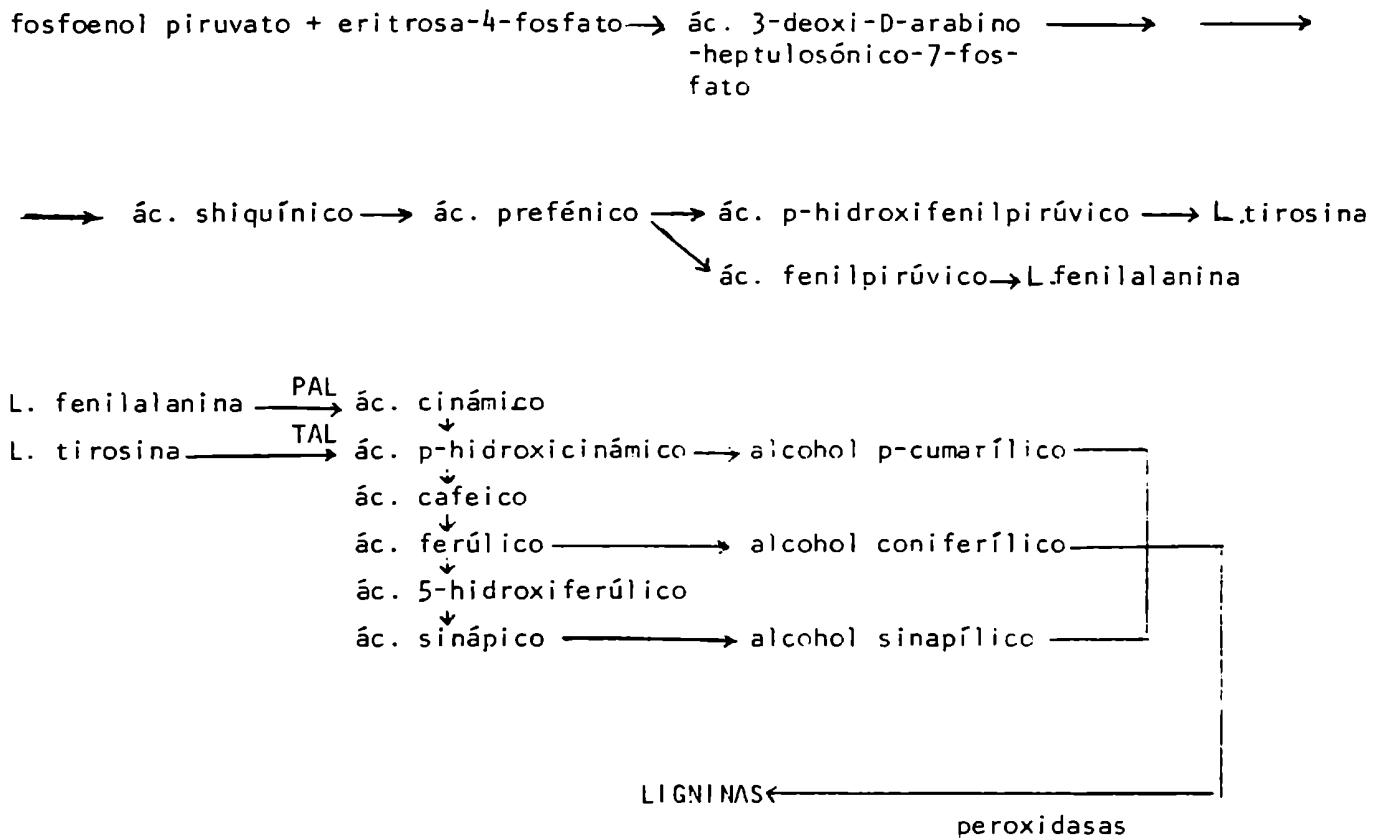


Figura 18: Camino biosintético de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y de ligninas, a partir de carbohidratos.

El ápice podría constituirse en un destino fuerte para el flujo de carbohidratos. Por el contrario en la etapa IV, de crecimiento activo e intensa fotosíntesis, aumentaría nuevamente el contenido de carbohidratos en los tallos. Adicionalmente Vrânceanu (op. cit.) describe que el sistema radical alcanza su máximo crecimiento en floración. Nuestros estudios anatómicos (III.4) y los de Thoday (1930) demuestran además que en el estadio IV es mayor la lignificación de los tejidos de la base del tallo. Por ello esta zona podría convertirse, en ese estadio, en un destino fuerte del flujo de carbohidratos.

Cabe señalar que los resultados obtenidos y las hipótesis construidas a partir de los mismos son contrarias a las sugerencias de Auger y Nome (1970) quienes relacionan una mayor susceptibilidad con un mayor contenido de azúcares en los tallos si bien dicha idea no está abalada por resultados analíticos.

III.2.2.2. Cambios en el contenido de aminoácidos libres

El efecto de los aminoácidos libres sobre la susceptibilidad es variable y depende del tipo de compuesto involucrado y del sistema hospedante-patógeno.

Bell (1981) en su revisión acerca de los mecanismos bioquímicos de defensa, cita un importante número de casos en los que ciertos aminoácidos libres cumplen una misión importante en la defensa preinfeccional, debido a su efecto inhibitorio sobre el crecimiento patogénico. Por el contrario, aumentos en el contenido de estos compuestos se han relacionado, en otros casos, con un incremento en la susceptibilidad a enfermedades (Bell, 1980). Flood y Kirkham (1960) observaron que el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos sobre Venturia sp. disminuye al aumentar la concentración de nitrógeno en el medio basal, y parece depender de un delicado equilibrio entre las concentraciones de fenoles y aminoácidos.

Desde otro punto de vista, el contenido de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina será, sin duda, un factor importante en la defensa, ya que estos compuestos aromáticos son metabolitos intermediarios que proveen el esqueleto de fenilpropano para la síntesis de ligninas, flavonoides y demás compuestos fenólicos (Kosuga, 1969) (Figura 18).

El análisis cuantitativo de los aminoácidos libres en la base de los tallos sanos de girasol, cultivados con 16 hs de luz, no arrojó diferencias significativas entre los distintos estadios. Únicamente se observó una tendencia al incremento postinfeccional en el estadio susceptible (II) (Tabla XIII).

En cultivares de arroz resistentes a Xanthomonas oryzae (Purushothaman, 1974) decrece el contenido postinfeccional de aminoácidos libres. Por el contrario aumenta en los cultivares susceptibles. Este último hecho se correlaciona negativamente con la actividad de la fenilalanina amonioliasa PAL. La menor actividad de esta enzima, con el consecuente incremento de su sustrato, se debería en ese caso a un sistema inactivante de la liasa en los cultivares susceptibles. Igualmente, el contenido de aminoácidos libres se incrementa en arroz cuando es inoculado con razas virulentas de Pyricularia oryzae (Sridhar y Ou, 1974). Estos autores consideran que el incremento puede deberse a la destrucción de proteínas por el patógeno y opinan que la toxicidad de los compuestos fenólicos se reduciría debido a la rápida ruptura de los mismos en presencia de un mayor contenido de amino nitrógeno (Kirkham, 1954; Flood y Kirkham op. cit.).

De los aminoácidos que se acumulan en los tallos del estadio más susceptible de girasol sería necesario un análisis cualitativo para poder aseverar que se trata de intermediarios del camino biosintético de fenoles. Como se pondrá de relieve en el capítulo V ciertos de estos compuestos estarían relacionados con la defensa en las edades tolerantes, en las cuales se acumulan. La demostración de que la no acumulación de fenoles estaría acompañada por el incremento de metabolitos intermediarios en el estadio susceptible, permitiría aclarar los procesos metabólicos que llevan a la susceptibilidad en la edad II. Tampoco debiéramos descartar que la acumulación postinfeccional en las plantas susceptibles se deba a una mayor degradación de proteínas por una mayor masa patogénica. Sin embargo los estudios enzimáticos realizados con S. sclerotiorum, si bien mencionan la producción de proteasas por parte de este hongo, no le adjudican un papel importante en la patogénesis.

Tabla XIII: Contenido de aminoácidos libres totales en la zona de interacción de tallos inoculados y en tejidos similares de tallos sanos, de distintas edades (mg/gr de peso seco).

	I	Estadios II	IV
Control	11,5 ^a	17,0 ^a	16,5 ^a
Inoculado		33,0 ^b	12,0 ^a

Los valores son promedio de 3 repeticiones (cada una proveniente del agrupamiento de 6 a 12 individuos). Letras distintas indican diferencias significativas al 5%. I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto. -: dato faltante.

III.2.3. Cambios en la susceptibilidad a las fitotoxinas y enzimas fúngicas:

Contenido de calcio en los tejidos sanos

La sensibilidad de los tejidos vegetales a los metabolitos secundarios y enzimas del patógeno puede variar con la edad del hospedante (Bell, 1980). Por ejemplo, el incremento de la resistencia de las plántulas al vuelco (damping off) ha sido asociado con una disminución de la sensibilidad de los tejidos a las enzimas hidrolíticas, particularmente a las pectinasas (Bell, op. cit.). Bateman y Lumdsden (1965) notaron que los hipocótilos de poroto de 4 y 16 días de edad contenían 0,38 y 1,92% de calcio, respectivamente. La pectina de hipocótilos de 8 y 16 días contenía 0,5 y 0,3% de metoxilos, respectivamente. Debido a esto, los mencionados autores postularon que el aumento en la resistencia de los hipocótilos durante el proceso de maduración se debería a la conversión de la pectina en pectato de calcio, el cual es más difícil de atacar por las PG fúngicas. En el caso de ciertas virosis y enfermedades fúngicas, el calcio se deposita postinfeccionalmente en las paredes celulares confiriéndoles resistencia a la degradación.

Auger y Nome (1970) encontraron que las plantas de girasol crecían 80 cm entre el período de 5 pares de hojas (tolerante) y el de botón (susceptible), en condiciones de campo. Adjudicaron la susceptibilidad en el estadio de botón a que durante esta rápida fase de crecimiento el calcio se diluiría en los tejidos con la consecuente disminución en el contenido de pectatos de calcio resistentes a la degradación enzimática. Esto favorecería la acción de las enzimas pectolíticas en este estadio. Lumdsden (1979) describe el efecto sinérgico del ácido oxálico, toxina de S. sclerotiorum, sobre la actividad de la PME fúngica a través de su acción quelante del calcio.

Con el objeto de corroborar la hipótesis formulada por Auger y Nome (op. cit.) se determinó el porcentaje de calcio en los tallos sanos de distintas edades, de plantas cultivadas con 16 hs de luz en cámara bioclimática.

No ha sido posible hallar evidencias que apoyan dicha hipótesis, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los contenidos de calcio en los tejidos (Tabla XIV). Sin embargo la tendencia de los resultados se dirige hacia una disminución con la edad. Al igual que en este caso Carter et al. (en

Bell, 1980) no encontraron relación entre la edad de las plántulas de algodón y el contenido de calcio y de magnesio. En ese caso, la insensibilidad a las enzimas fúngicas se debería aparentemente a su inactivación por productos de la oxidación de la catequina (Hunter, 1978).

En cuanto al girasol, es necesario señalar diferencias importantes entre los ensayos realizados a campo y en cámara bioclimática, que pueden llevar a la no detección de este eventual componente de la defensa. Dicho aspecto consiste en que, en las condiciones controladas de cultivo no se producen incrementos tan abruptos de altura como los observados a campo (Tabla XV). Por otro lado, las plantas son sensiblemente más pequeñas. Lo antedicho pone de relieve la necesidad de realizar ensayos comparativos con material crecido en condiciones naturales antes de descartar la hipótesis puesta en juego.

También es interesante señalar un aparente desfase entre lo descrito por Auger y Nome (op. cit.) y Vrânceanu (1977). Este último autor indica que la fase de crecimiento activo se produciría luego de la aparición del botón. Por el contrario, los primeros autores la ubican más tempranamente. Esto indicaría que la localización temporal de dicho período es variable respecto a la aparición del botón floral, de acuerdo con el material utilizado y las condiciones de crecimiento. De todas maneras, los datos disponibles sobre el contenido de calcio en plantas de distintas edades, a campo tampoco apoyarían la hipótesis propuesta ya que, según Robinson y Hodger (1977) no existirían diferencias de calcio con la edad. Sin embargo, no debería dejarse de lado la posibilidad que si bien en girasol no varíe el contenido total de Ca en los tejidos con la edad, sí lo haga la proporción unida a pectatos, aspecto que no ha sido evaluado en los trabajos citados.

Con respecto a diferencias en la sensibilidad a toxinas, Noyes y Hancock (1981) sugirieron que la diferencia en susceptibilidad frente a la podredumbre basal de distintos materiales de girasol, en una única edad, podría deberse en parte a distintos grados de tolerancia de los tejidos foliares al ácido oxálico. No debería, encontes, descartarse que las diferencias de marchitez foliar entre las edades se deban a una variación de este tipo.

III.2.4. Cambios en las barreras químicas

En el resto de este capítulo se describirán los experimentos preliminares que llevaron al conocimiento de la existencia de mecanismos de defensa de

Tabla XIV: Contenido de calcio en la base de tallos de girasol sanos de distintas edades (% respecto al peso seco total).

	Estadios		
I	II	IV	
1,6 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	

Los valores son promedio de 6 repeticiones (con 2 replicas por repetición). Valores seguidos por letras iguales indican que no existen diferencias significativas. I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto

Tabla XV: Alturas promedio de las plantas de diferentes edades utilizadas en distintos experimentos (cm).

Experimento	Estadio		
	I	II	IV
1	19	25	50
2	18	33	56
3	18	23	45

tipo bioquímico. A tal fin se comparó el efecto de diversos extractos, obtenidos a partir de tallos sanos y enfermos, sobre el crecimiento micelial in vitro (CM). Algunos ensayos se realizaron con plantas cultivadas en cámara bioclimática y otros con material cultivado en el campo. En algunos casos se analizó la diferencia entre estadios, en otros entre diversas zonas del tallo, o entre individuos susceptibles y tolerantes de una única edad. Esto permitiría construir un esquema global acerca de la presencia, distribución y localización de estos mecanismos en materiales de distintas edades y condiciones de cultivo.

III.2.4.1. Estudios preliminares sobre el crecimiento in vitro

Como la detección de la presencia de barreras químicas se basaría en la comparación del efecto de distintos extractos de girasol sobre el CM, fue necesario conocer su comportamiento en diversos medios de cultivo. Los parámetros analizados fueron el efecto de distintas concentraciones de extracto de malta sobre la velocidad del crecimiento fúngico, y el número y peso seco total de esclerocios formados (II.2.1.a). El objetivo final fue seleccionar un medio en el cual el nivel de nutrientes no fuese el óptimo para el crecimiento fúngico y, de esta forma se pusiese de manifiesto la presencia de compuestos fungitóxicos presentes en los extractos.

De la representación gráfica del CM en función del tiempo a partir de la inoculación (Figura 19), fue posible distinguir tres tipos de comportamientos sobre la base de las pendientes de las curvas obtenidas. Las curvas de mayor pendiente correspondieron a los medios más ricos: AM 3 y 2%. Los cultivos crecidos sobre el extracto de malta al 1; 0,5; 0,4; 0,3 y 0,2% mostraron curvas de pendientes intermedias. El menor crecimiento se produjo en el medio AM 0,1%. Las diferencias entre los promedios de los crecimientos de los dos primeros grupos se hicieron significativas al 7º día para los dos primeros grupos. Por el contrario el crecimiento en el medio AM 0,1% se diferenció del resto a partir del 4º día.

Se encontró un comportamiento similar al precedente al analizar el número y peso seco total de esclerocios formados en cada medio (Figura 20) al 10º día después de la inoculación. A medida que el medio es más rico aumentan los parámetros mencionados. Asimismo se incrementa la densidad de la mata micelial.

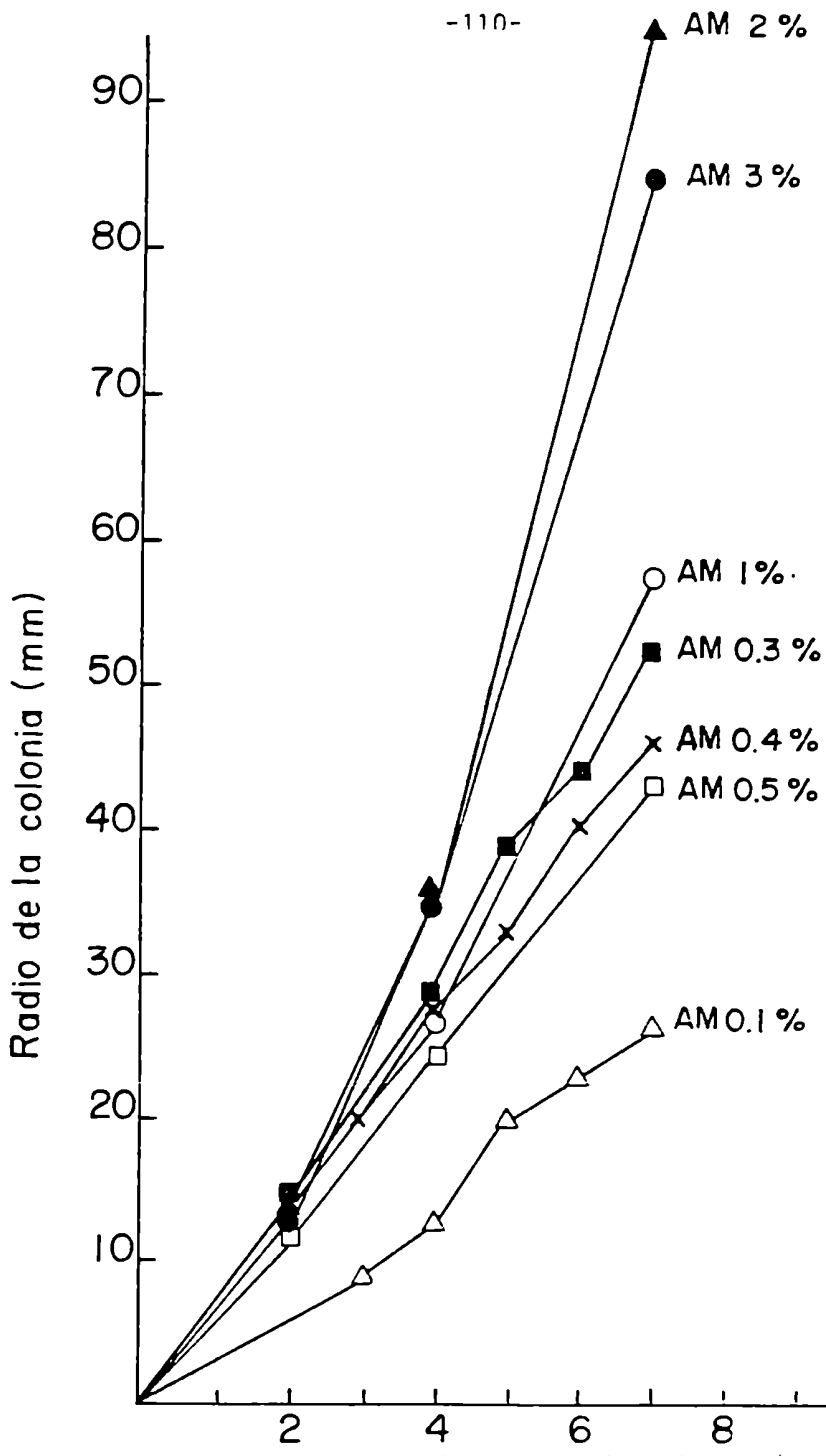


Figura 19: Crecimiento micelial en función del tiempo de inoculación, sobre medios de cultivo agar extracto de malta (AM) conteniendo diversas concentraciones de extracto de malta (0,1-3%) (cada valor es promedio de 10 repeticiones).

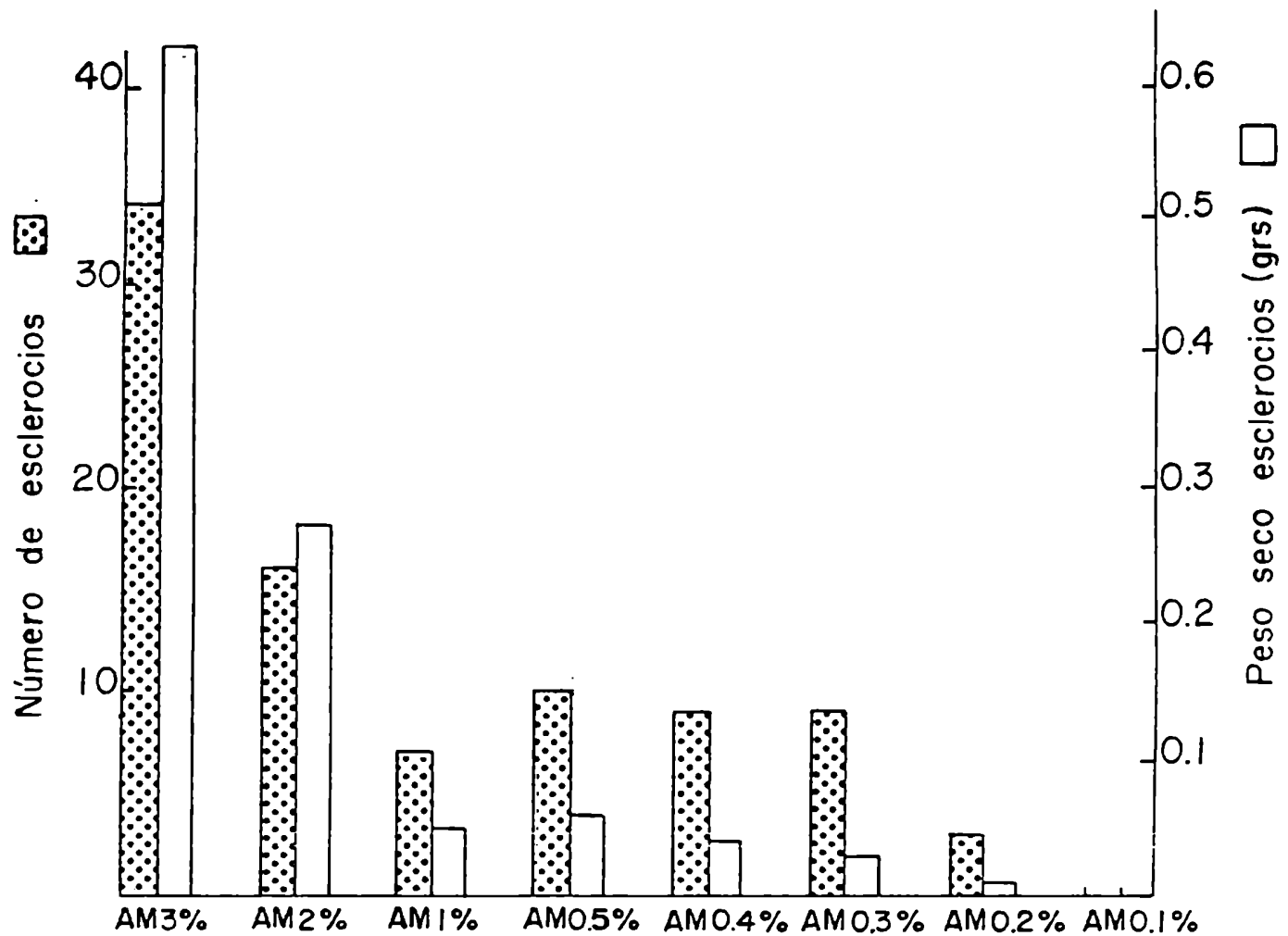


Figura 20: Número y peso seco total de esclerocios formados sobre medios de cultivo agar extracto de malta (AM), que contenían diversas concentraciones de extracto de malta (0,1-3%) (total correspondiente a 10 repeticiones por tratamiento).

Mientras en los medios con mayor concentración de extracto de malta el micelio fue denso y algodonoso, en el medio AM 0,1% este fue hialino y apretado al agar.

En los medios AM 3 y 2%, los primeros esclerocios maduros (que pueden desprenderse de la superficie micelial sin alterarla) aparecieron al 4º día. En los restantes medios en los que se produjeron esclerocios, a excepción del más pobre (AM 0,1%), los primeros esclerocios maduros aparecieron al 7º día (Figura 21). En todos los casos, la totalidad de los esclerocios finalizó su maduración al 10º día.

Fue posible confirmar observaciones generales acerca de la formación de los esclerocios. Dichas estructuras se localizaron siempre en los bordes de la mata micelial, en forma de círculos concéntricos. Este evento coincidiría con el agotamiento del medio de cultivo, es decir podría estar relacionado con cambios en la disponibilidad de nutrientes. Al comienzo, los primordios son formados por el agregado de hifas vegetativas blancas en forma de montículos. Dichos agregados se cubren luego por gotas de exudado hialino. Según Le Tourneau (1979) dichas gotas estarían cubiertas por una membrana y contendrían una variedad de material orgánico e inorgánico, incluyendo numerosas enzimas, las cuales cambiarían de concentración a medida que el esclerocio madura. Aún no estaría del todo claro el rol exacto de dichos exudados. Podrían tener una función osmótica en la traslocación, o estar involucrados en la pérdida de agua desde el esclerocio durante su maduración. La formación de esclerocios involucra intensos cambios celulares y la movilización y deposición de diversos materiales. Por lo tanto no es de extrañar que los micelios más vigorosos y abundantes, que han crecido en medios más ricos posean la capacidad de formar mayor número de estas estructuras de reserva. Una vez formados los primordios, desde el micelio se movilizan los diversos materiales relacionados con la síntesis de los compuestos de reserva que están presentes en el esclerocio maduro.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar al medio AM 0,1% para la realización de los ensayos biológicos. Las excepciones se señalarán en cada caso particular.

III.2.4.2. Mecanismos bioquímicos en plantas cultivadas en cámara bioclimática

III.2.4.2.1. Efecto de extractos acuosos obtenidos en frío

a) Planta sana

Este experimento tuvo como propósito detectar eventuales mecanismos

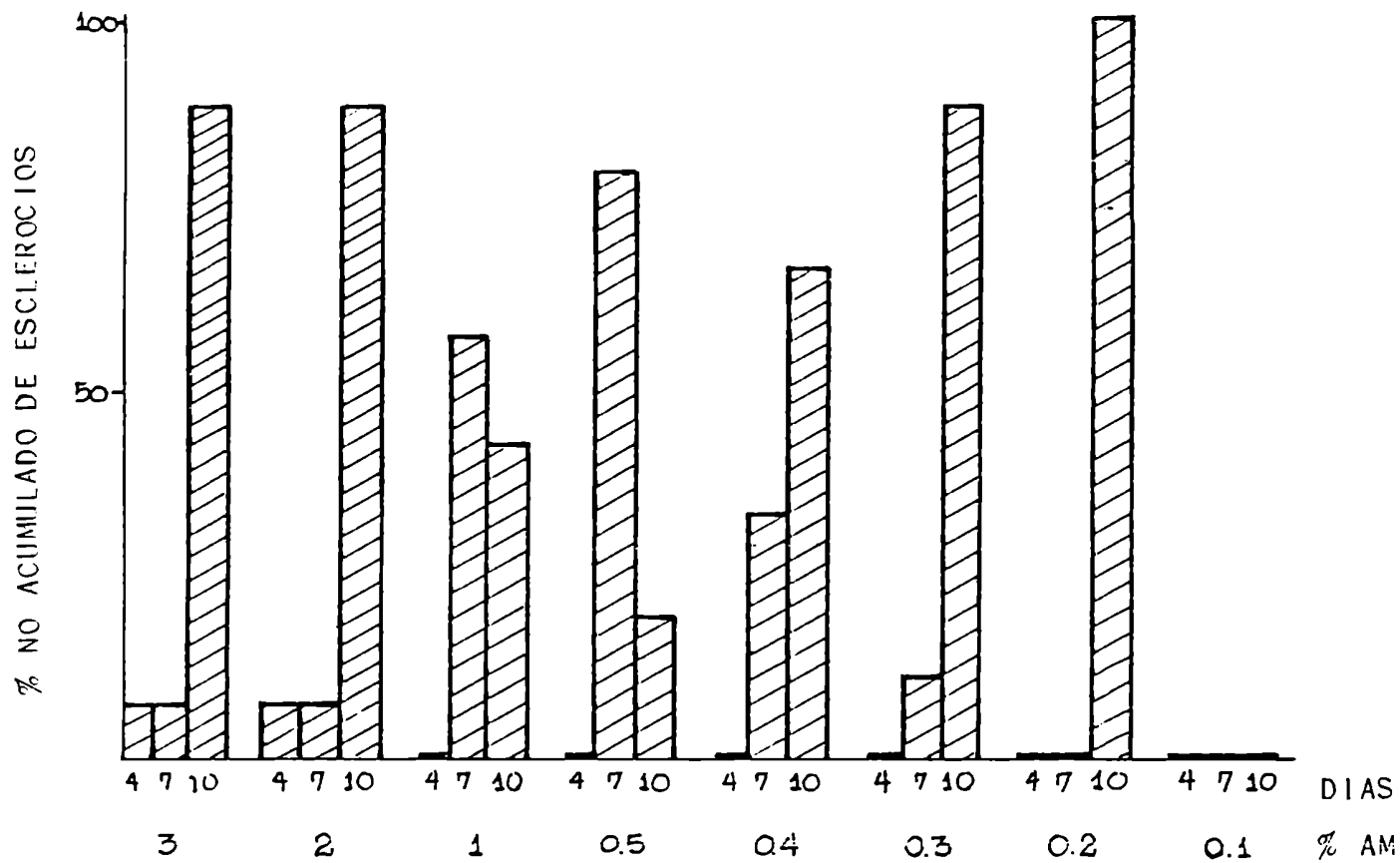


Figura 21: Porcentajes no acumulados de esclerocios maduros, respecto al total formado sobre medios de cultivo que contenían distintas proporciones de extracto de malta (0,1-3%), en función del tiempo de inoculación (total correspondiente a 10 repeticiones por tratamiento).

preinfeccionales. Se obtuvieron extractos acuosos siguiendo la metodología descrita en el punto 11.2.5.2.1.1. Se utilizaron los tallos completos, desprovistos de hojas, de plantas en estadio vegetativo. Las mismas pertenecían al híbrido Super 500 (Cargill) y habían sido cultivadas bajo 16 hs de luz.

Se estudió además si extractos esterilizados por distintos métodos poseían efectos diferentes sobre el crecimiento micelial (CM). Parte del extracto fue esterilizado en autoclave e incorporada luego al medio de cultivo basal (AM 0,1%) estéril, mientras que otra lo fue por filtración.

Los extractos acuosos de los tallos sanos presentaron siempre un efecto promotor del CM, al menos con las concentraciones utilizadas. Sin embargo solo en aquellos casos en que el extracto había sido esterilizado por calor (autoclave), el efecto fue significativo ($P: 0,05$) (Tabla XVI).

Los resultados obtenidos permitieron concluir que, bajo las condiciones de trabajo utilizadas, no es posible detectar efectos inhibidores preinfeccionales. Por el contrario, los extractos obtenidos de tallos sanos no solo promovieron el CM sino también el número y peso seco de los esclerocios (Figura 22), en concordancia con el comportamiento observado al cultivar al hongo en medios diferencialmente enriquecidos (cfr. 111.2.4.1.).

En cuanto al ensayo de los dos tipos de esterilización, la idea de probarlos obedeció a la inquietud de esta eliminando componentes termolábiles al emplear un método que involucra el uso de altas temperaturas.

Sin embargo de acuerdo con lo expresado por Riberau-Gayon (1972), que sin duda coincide con los métodos generales de extracción de la mayoría de los componentes naturales de las plantas, es necesaria la inactivación de las enzimas presentes en los extractos. De no ser así, estas podrían seguir actuando sobre los sustratos, en especial sobre aquellos que se liberan como consecuencia de la destrucción celular, pudiendo alterarlos. Tal es el caso de las enzimas hidrolíticas, oxidativas, etc. Las diferencias obtenidas con los dos métodos de esterilización utilizados podrían deberse, en consecuencia, a hechos de este tipo.

Tabla XVI: Efecto producido por extractos acuosos obtenidos en frío, provenientes de tallos sanos de edad 1, sobre el crecimiento micelial al 7° día de la inoculación (24 mg de peso fresco de tejido inicial extraído/ml de medio).

Extracto autoclavado	Extracto filtrado
+ 19,4%*	+ 11,0%

+: efecto promotor

*: efecto significativo al 5%

Los valores son promedio de 5 repeticiones

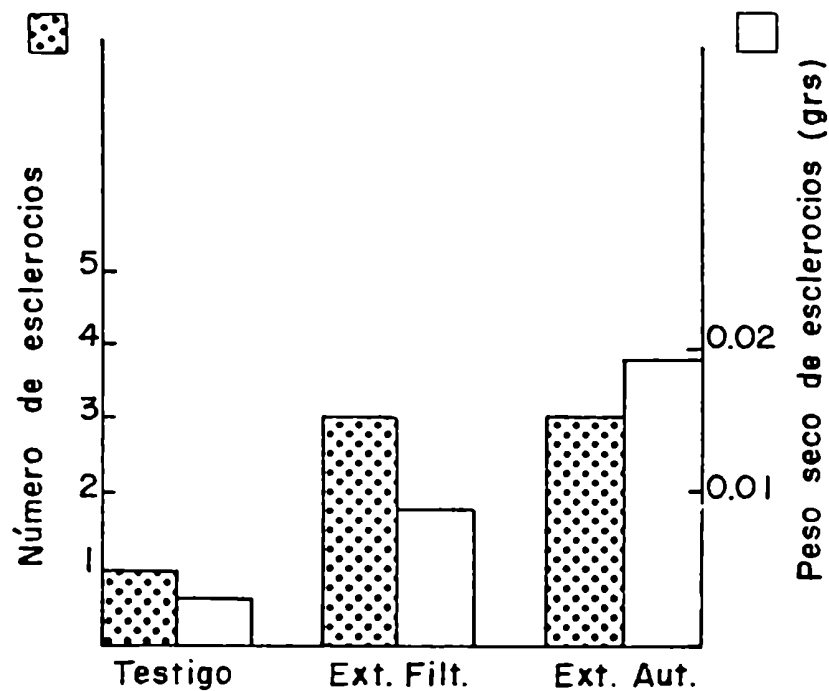


Figura 22: Número y peso seco total de esclerocios formados sobre un medio basal (AM 0,1%), y sobre dicho medio más el agregado de extractos acuosos obtenidos en frío de tallos sanos de edad 1 (24 mg de peso fresco de tejido inicial extraído/ml de medio) (total correspondiente a 5 repeticiones por tratamiento).
 Ext. Filt.: extracto esterilizado por filtración;
 Ext. aut.: extracto esterilizado en autoclave.

b) Plantas inoculadas

Este experimento tuvo por objeto detectar eventuales mecanismos postinfeccionales que se relacionaran con las diferencias de susceptibilidad encontradas en los distintos estadios. Se empleó el material vegetal que se había usado para construir la curva de susceptibilidad, con plantas crecidas con un fotoperíodo de 12 hs, y que se describió en el punto III.1.4.1.

Se probó el efecto de extractos acuosos obtenidos en frío, provenientes de la zona de avance del patógeno sobre el CM. Aquellos obtenidos de tallos de los estadios I, II y III no produjeron efectos significativos sobre el CM (Tabla XVII). Esto concuerda con el hecho de que bajo las condiciones de luz empleadas, los mencionados estadios resultaron susceptibles al patógeno (III.1.4.1.). Por el contrario, el extracto proveniente de los tallos del estadio tolerante IV, inhibió significativamente el CM.

El número promedio de esclerocios formados (Tabla XVII) por caja fue significativamente mayor ($P:0,01$) en los medios que contenían extractos de los tallos de edad I y II que en los medios que contenían extractos de tallos de edades III y IV. El hecho de que los extractos provenientes de los tallos del estadio tolerante (IV) presenten un efecto inhibitor del CM y de la formación de esclerocios al compararlo con los provenientes de los otros estadios, hace suponer la presencia de mecanismos bioquímicos postinfeccionales.

III.2.4.2.2. Efecto de extractos acuosos, etanólicos y clorofórmicos.

Otra metodología de extracción que se utilizó para detectar mecanismos bioquímicos de defensa es la que se describe en el punto II.2.5.2.1.1. y que consiste en la extracción sucesiva del material vegetal con una serie de solventes.

Se estudió el efecto de los extractos acuosos, etanólicos y clorofórmicos sobre el crecimiento micelial (CM) in vitro. Los mencionados extractos provinieron de la zona de avance del patógeno de plantas inoculadas de las 3 edades seleccionadas, y de tejidos similares de plantas control, cultivadas con 16 hs de luz (cfr. III.1.4.2.). Se realizaron dos ensayos completos.

Tabla XVII: Efecto de extractos acuosos obtenidos en frío, de la zona de interacción de tallos inoculados de distintas edades, sobre el crecimiento micelial al 7º día (% respecto al crecimiento en medio basal) y número promedio de esclerocios formados por caja (0,1 mg de peso seco de extracto/ml de medio).

	Estadios				Control
	I	II	III	IV	
Efecto	+5%	+4%	+1%	-8%*	0%
Promedio de esclerocios por caja	0,6 ^{ab}	0,75 ^b	0,43 ^a	0,29 ^a	0,5 ^{ab}

+: efecto promotor; -: efecto inhibidor

*: efecto significativo al 5%

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 1%. Los valores son promedio de 8 repeticiones. I: vegetativo; II: botón floral cerrado; III: botón floral y IV: botón floral abierto.

a) Extractos acuosos

En la Tabla XVIII se ha representado el efecto de los distintos extractos sobre el CM, al 7º día después de la inoculación. Los provenientes de plantas no inoculadas inhibieron en forma similar el CM, independientemente del estadio. Los provenientes de plantas inoculadas de los estadios menos susceptibles (I y IV) inhibieron por igual el CM en tanto que aquel de plantas en el estadio más susceptible (II) lo promovió. No se hallaron diferencias significativas entre los efectos inhibitorios producidos por los extractos de plantas inoculadas y no inoculadas.

La función que describe adecuadamente la velocidad del crecimiento micelial fue de tipo lineal para todos los tratamientos utilizados (Figura 23) ($P: 0,01$), al menos entre el 2º y 8º día después de la inoculación.

Se encontró un retardo mayor del comienzo del crecimiento en todos los medios de cultivo con agregados de extracto respecto al medio control. Dicho retardo no difirió entre los medios con agregados. Un efecto similar se determinó al probar la influencia de extractos crudos acuosos de raíces de frutilla inoculadas, sobre el CM de Verticillium albo-atrum (Okasha et al., 1968).

La pendiente de la curva del tratamiento II (máxima susceptibilidad) inoculado, comprendida entre el 2º y 8º día fue significativamente mayor ($P: 0,01$) que la del control en el mismo tramo. Esto implica una promoción significativa del CM por el mencionado extracto que se refleja a través de una mayor velocidad de crecimiento. Sin embargo, al observar la Figura 23 es posible distinguir dentro dicho tratamiento dos períodos lineales de diferentes pendientes. El período comprendido entre el 2º y 4º día, con pendiente que no difiere significativamente de la del control; y el período comprendido entre el 4º y 8º día cuya pendiente resultó significativamente mayor ($P: 0,01$) (aproximadamente el doble) que la del control (Tabla XIX). Esto parece indicar que sería necesario un cierto lapso para que se manifieste la presencia de compuestos promotores del CM en este medio de cultivo.

Las pendientes de las curvas de los tratamientos I y IV inoculado fueron significativamente menores que la del control ($P: 0,01$), pero no difirieron entre sí. Esto indicó que dichos extractos inhiben significativamente y por igual el CM. La tasa del crecimiento fúngico en estos casos se vió reducida aproximadamente en un 50% con respecto a la del medio control (Tabla XIX).

Tabla XVIII: Efecto de extractos de zona de interacción de plantas inoculadas y no inoculadas de edades distintas, sobre el crecimiento micelial al 7º día (% respecto al crecimiento sobre el medio basal).

Extracto		Estadio		
		I	II	IV
Acuoso (200 mg PFi/ ml)	Inoculado	-64 ^a	+3 ^b	-55 ^a
	Testigo	-64 ^a	-60 ^a	-64 ^a
Etanólico (90 mg PFi/ml)	Inoculado		3 ^a	- 6 ^a
	Testigo	+8 ^a	0 ^a	- 1 ^a
Cloroformo (60 mg PFi/ml)	Inoculado	0 ^a	-18 ^b	-51 ^c
	Testigo	-4 ^a	+22 ^b	-22 ^b

Los valores son promedio de 2 experimentos completos con 6-8 repeticiones por tratamiento.

Promedios seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas al 1%. Las comparaciones son únicamente válidas dentro de cada extracto.

+: promoción; -: inhibición; PF: peso fresco inicial

I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

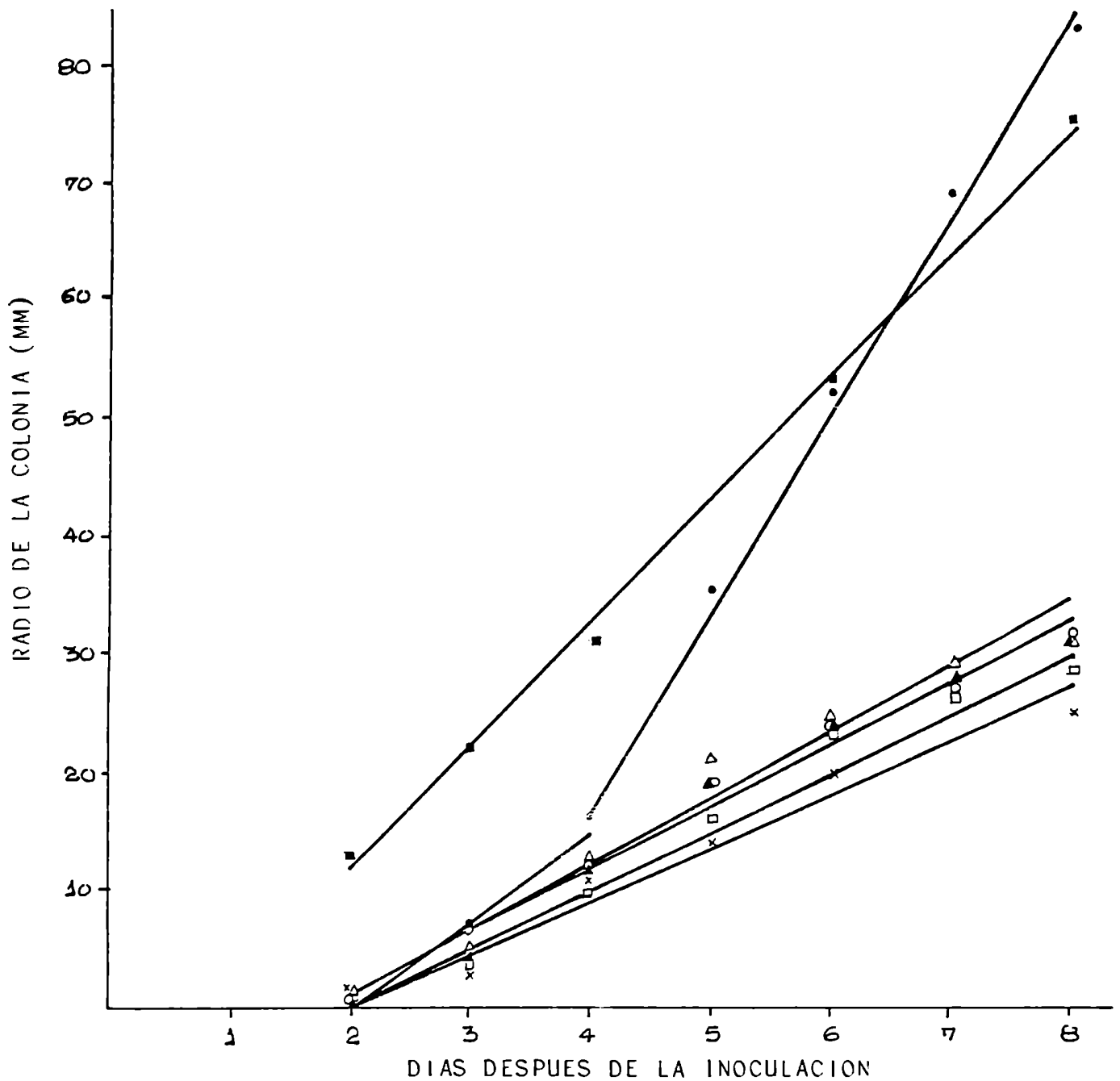


Figura 23: Crecimiento micelial en función del tiempo de inoculación sobre un medio de cultivo basal (■); y en dicho medio más el agregado de extractos acuosos obtenidos de tallos inoculados (margen de las lesiones) y sanos, de distintas edades. □: I inoculado; x: I testigo; ●: II inoculado; △: II testigo; △: IV inoculado y 0: IV testigo (200 mg de peso fresco de tejido inicial/ml de medio). (Cada valor es promedio de 8 repeticiones).

Tabla XIX: Coeficientes de regresión lineal obtenidos mediante el método de los cuadrados mínimos para las curvas que representan el CM en función del tiempo, en medios con agregados de extractos acuosos provenientes de la zona de interacción de tallos inoculados y tejidos similares de tallos testigo, de distintas edades.

Estadio	Coefficiente de regresión
Control (sin extracto)	1,05 a
I inoculado	0,50 b
I testigo	0,55 b
II inoculado (2°-8° día)	1,46 c
II inoculado (2°-4° día)	0,78 a
II inoculado (4°-8° día)	1,68 c
II testigo	0,55 b
IV inoculado	0,55 b
IV testigo	0,53 b

Cada valor de pendiente se obtuvo a partir de 8 repeticiones.

Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas al 1%.

I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

Las pendientes de las curvas de los tratamientos I, II y IV testigo (no inoculadas) resultaron significativamente menores que la del control ($P:0,01$), pero no difirieron entre sí (Tabla XIX). Tampoco fueron diferentes a las obtenidas para los estadios I y IV inoculado. Esto indicó que los extractos de plantas sanas inhiben por igual el CM, independientemente de la edad.

Si se estudian comparativamente los resultados obtenidos, y se supone que la inhibición producida por los extractos de individuos no inoculados se debe a la presencia de antibióticos constitutivos, se debería considerar una de tres posibles situaciones: a) que su naturaleza no sea la misma en los tres estadios, pudiendo ser eliminados por acción del hongo en el más susceptible; b) que la naturaleza sea la misma pero que se den las condiciones para que el hongo puede detoxificarlos en el estadio más susceptible; o c) que sean igualmente detoxificados con lo cual no cumplirían un rol eficaz en las diferencias en susceptibilidad observadas entre estadios. Las dos primeras alternativas pueden ser ejemplificadas a través de lo que ocurre en otros sistemas hospedante-patógeno. En el caso de la compuesta Carthamus tinctorius (Thomas y Allen, 1971), tanto las plántulas como las plantas adultas son resistentes a Phytophthora drechsleri, no así los estadios intermedios. Esto se debe a la presencia y acumulación en los estadios resistentes de poliacetilenos constitutivos que limitan el desarrollo de las lesiones. Por otro lado, Ludwig et al. (1960) encontraron en coleóptiles de avena de edades susceptible y tolerante la presencia de compuestos fungitóxicos preexistentes estrictamente solubles en agua. La diferencia en la respuesta al hongo se debía a la presencia en la edad susceptible de un mayor contenido en Ca^{++} y Mg^{++} que al ser liberados acomplejaban a los compuestos inactivándolos.

Numerosos patógenos poseen la capacidad de metabolizar sustancias tóxicas en una variedad de formas (Bell, 1981; Woodcock, 1963; Friend, 1977). Tal es el caso de Sclerotinia trifoliorum, altamente virulenta, que puede detoxificar fitoalexinas del trébol in vivo e in vitro (Bell, op. cit.). De tal forma sería posible que en las plantas sanas de la edad más susceptible (II), las sustancias fungitóxicas hayan sido metabolizadas y transformadas en productos inócuos para el hongo. Esto explicaría la promoción observada con los extractos de individuos inoculadas en el estadio II.

Si en cambio se postula la tercer alternativa, es decir que las sustancias inhibidoras en los tallos no inoculados pudieran ser detoxificadas en to dos los estadios por igual, se podría suponer que se ha producido una mayor síntesis de sustancias antifúngicas postinfeccionales en los estadios menos susceptibles.

b) Extractos etanólicos

No se han observado diferencias entre los efectos producidos por los ex tractos de plantas inoculadas y no inoculadas en ningún estadio. Por otro lado, los extractos etanólicos no produjeron efectos significativos sobre el CM, ya que los crecimientos en los medios con agregado de estos extractos no difirieron de los obtenidos en los medios control (Tabla XVIII).

c) Extractos clorofórmicos

Los provenientes de plantas inoculadas y no inoculadas en el estadio vegetativo (I) permitieron un CM igual que en el medio control, al 7^o día después de la inoculación. El resto de los extractos inhibió significativamente el CM. No se hallaron diferencias significativas entre los efectos de plantas en el es tadio II inoculado y no inoculado y en el estadio IV no inoculado. Sin embargo la inhibición provocada por los extractos de plantas inoculadas en este último estadio fue significativamente mayor ($P:0,01$) que la presentada por el resto (Tabla XVIII).

Al igual que en el caso de los extractos acuosos, la velocidad del CM en los medios con residuos de extractos clorofórmicos tuvo un ajuste de tipo lineal independientemente del tratamiento ($P:0,01$) (Figura 24).

La velocidad del CM no difirió significativamente en los medios con extractos de edad I ni entre sí (plantas inoculadas y testigo), ni respecto a la obtenida en el medio control. Por el contrario, a excepción del tratamiento II inoculado, el resto de los extractos tuvo pendientes significativamente menores que la del control ($P:0,01$).

Mientras los tratamientos II y IV testigo disminuyeron la velocidad del CM en un 30%, el IV inoculado lo hizo en un 68% (Tabla XX). La pendiente en este último estadio fue significativamente menor que en todo el resto ($P:0,01$). La

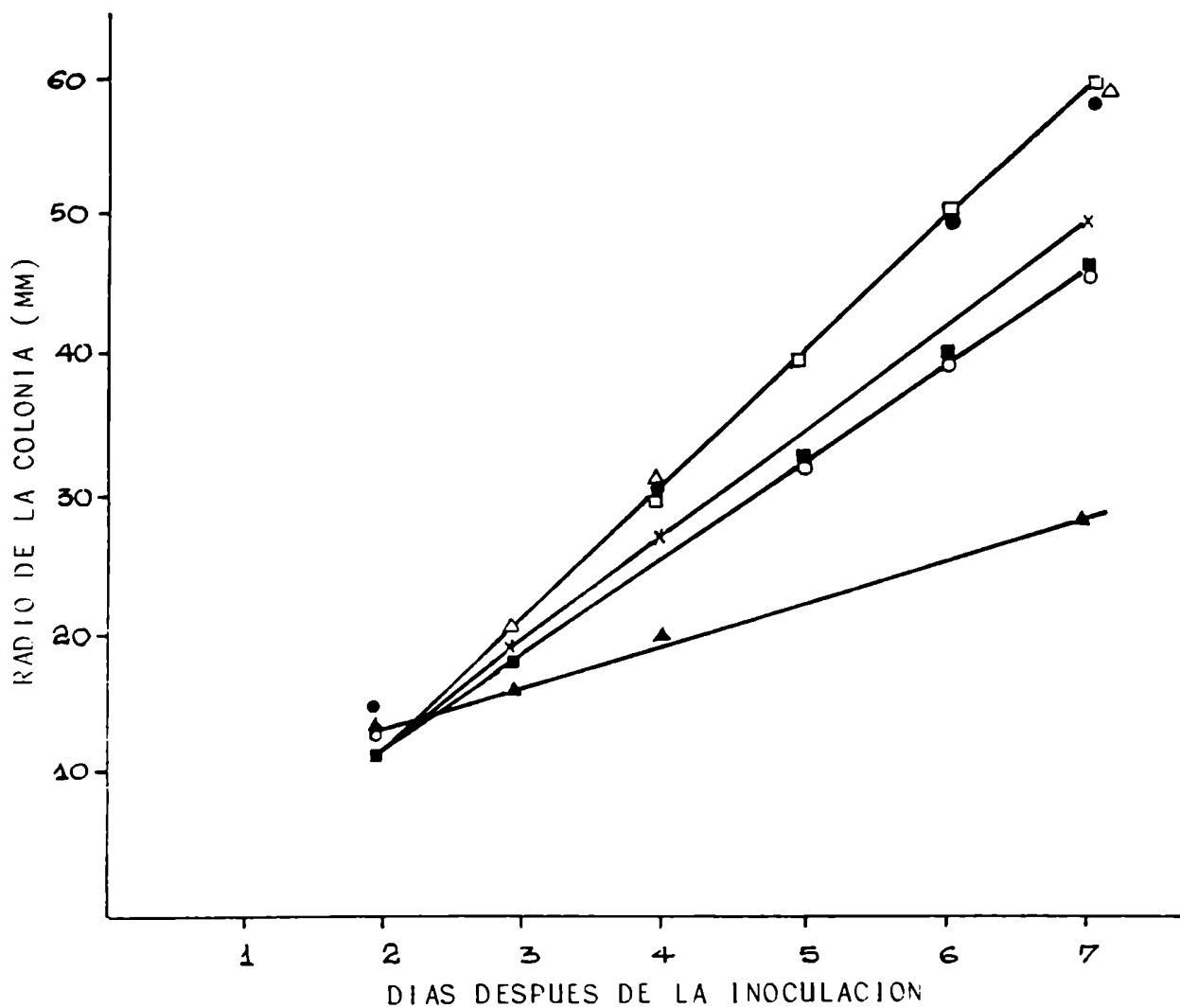


Figura 24: Crecimiento micelial en función del tiempo de inoculación, sobre un medio de cultivo basal (□), y en dicho medio mas el agregado de residuos de extractos clorofórmicos obtenidos de tallos inoculados (margen de las lesiones) y sanos de distintas edades. ●: I inoculado; Δ: I testigo; X: II inoculado; ■: II testigo; ○: IV testigo y ▲: IV inoculado. (60 mg de peso fresco de tejido inicial/ml de medio) Cada valor es promedio de 8 repeticiones.

Tabla XX: Coeficientes de regresión obtenidos mediante el método de los cuadrados mínimos para las curvas que representan el CM en función del tiempo en medios con agregados de extractos clorofórmicos provenientes de la zona de interacción de tallos inoculados y de tejidos similares de tallos testigo, de distintas edades.

Estadio	Coefficiente de regresión
Control (sin extracto)	1,03 a
I inoculado	1,01 a
I testigo	0,87 a
II inoculado	0,79 ab
II testigo	0,75 b
IV inoculado	0,33 c
IV testigo	0,70 b

Cada valor de pendiente se obtuvo a partir de 8 repeticiones.

Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas al 1%.

I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

pendiente obtenida con el extracto del estadio II inoculado no difirió de la del control ni de la del II y IV testigos.

Los resultados obtenidos sugieren que el estadio vegetativo (I) no poseería sustancias antifúngicas solubles en cloroformo ni antes ni después de la infección. El efecto preinfeccional presente en extractos del estadio II tendería a disminuir postinfeccionalmente (¿detoxificación?). En el estadio IV se induciría un incremento de compuestos antifúngicos preformados, o la síntesis de novo de sustancias inhibitoras del CM (fitoalexinas).

Un caso similar al propuesto ocurre en plántulas de algodón de diferentes edades inoculadas con Rhizoctonia solani (Hunter et al., 1978). En este caso la acumulación de compuestos preformados (terpenoides aldehidos) comienza al mismo tiempo en los dos estadios inoculados pero no persiste, o decrece, más allá de las 48 hs en el más susceptible. Por el contrario, en el estadio tolerante ellos se acumulan significativamente.

III.2.4.3. Mecanismos bioquímicos en plantas cultivadas en condiciones de campo

Con el objeto de conocer si los mecanismos bioquímicos puestos de manifiesto en los ensayos realizados con plantas cultivadas en cámara bioclimática también se presentaban en condiciones de campo, se realizó una serie de ensayos paralelos con material vegetal así cultivado. Las plantas se encontraban en estadio de primera semana de floración, y eran seleccionadas por resistencia a la podredumbre basal. Se estudiaron grupos de individuos que presentaron diversos grados de susceptibilidad frente al hongo.

III.2.4.3.1. Efecto de extractos acuosos obtenidos en frío.

En este caso realizaron dos experimentos completos con grupos de 5 plantas enfermas cultivadas en el campo Experimental de Cargill en Pergamino e inoculadas experimentalmente durante la campaña 1980-1981. Todos los individuos presentaban podredumbre avanzada. Se analizó el efecto sobre el CM in vitro de extractos acuosos obtenidos, según la metodología descrita en el punto II.2.5.2.1.1. de distintas zonas del tallo. Los extractos fueron esterilizados en autoclave.

En el experimento 1 (Tabla XXI), todos los medios con agregado de extractos produjeron un efecto promotor del CM, al 8º día de la inoculación. Sin embargo solo aquellos provenientes de las zonas "enferma" (E) y "Sana adyacente" (SA) resultaron significativos. En el experimento 2, si bien el efecto de la zona de "interacción" (I) fue levemente inhibitorio, el CM en dicho extracto no difirió significativamente del obtenido en el medio control. Al igual que en el primer experimento, los extractos obtenidos de las zonas E y SA promovieron significativamente el CM.

En el experimento 2 se analizó también el número de esclerocios formados por caja, y el peso seco de cada esclerocio, para cada tratamiento (Tabla XXII). Los extractos de las zonas SA y E promovieron también el número de esclerocios formados por caja y su peso seco individual. El extracto obtenido del margen de avance del patógeno (I), que no había afectado el CM, tampoco alteró el número y peso seco de los esclerocios.

Como consecuencia de los resultados obtenidos de los experimentos realizados con extractos acuosos obtenidos en frío, en cámara bioclimática y en condiciones de campo, se arribó a ciertas ideas generales:

- Para las concentraciones ensayadas, los extractos acuosos obtenidos en frío provenientes de los márgenes de las lesiones de plantas susceptibles, no modificaron el CM in vitro ni el número promedio de esclerocios por caja. Por el contrario los de individuos tolerantes los inhibieron.
- El ensayo realizado a campo permitió concluir que tanto los extractos de las zonas enfermas, altamente colonizadas, como los de los tejidos sanos adyacentes poseen un efecto significativamente promotor sobre el CM.

III.2.4.3.2. Efecto de extractos acuosos, etanólicos y clorofórmicos

Los extractos fueron obtenidos de la zona de avance de lesiones de plantas inoculadas artificialmente en Orán (Pica. de Salta) en el invierno de 1981. Pertenecían a líneas autofecundadas que estaban siendo mejoradas por selección recurrente, para resistencia a la podredumbre basal. Se encontraban en la primera semana de floración, y se cosecharon en el mes de setiembre, a los 15 días de

Tabla XXI: Efecto de extractos acuosos obtenidos en frío, provenientes de distintas zonas de tallos susceptibles inoculados a campo, sobre el CM al 8º día después de la inoculación (0,5 mg de peso seco residual/ml de medio) (% respecto al crecimiento sobre el medio basal).

Experimento	Zonas del tallo		
	Sana adyacente	Interacción	Enferma
1	+ 29 ^{a*} %	+ 15 ^b %	+ 60 ^{a*} %
2	+ 34 ^{a*} %	- 15 ^b %	+ 31 ^{a*} %

+: promoción; -: inhibición. *: efecto significativo respecto al control. Los valores son promedio de 6-8 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas al 1%. Las comparaciones son solo válidas dentro de cada fila.

Tabla XXII: Efecto de extractos acuosos obtenidos en frío, provenientes de distintas zonas de tallos susceptibles inoculados a campo, sobre el número de esclerocios por caja y el peso seco de cada esclerocio.

	Control	Zonas del tallo		Enferma
		Sana adyacente	Interacción	
Número de escl./caja	0,83 ^a	2,0 ^b	0,67 ^a	2,4 ^c
Peso seco/escl. (mg)	1,9 ^b	2,3 ^a	5,0 ^b	

Cada valor es el promedio de 6 repeticiones. Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas al 1%. Las comparaciones solo son válidas dentro de cada fila.

la inoculación. Se estudiaron grupos de 8-10 individuos elegidos al azar, que presentaban distinta susceptibilidad al patógeno: plantas con podredumbre incipiente (S_1) y plantas con podredumbre avanzada (S_7). Un grupo de plantas no inoculadas sirvió como control. La metodología seguida fue descrita en 11.2.5.2.1.2.

Los extractos acuosos de las plantas no inoculadas no inhibieron el CM a diferencia de lo que ocurrió con aquellas provenientes de la línea isogénica cultivada en cámara bioclimática (111.2.4.2.2.1.), a pesar de tratarse de métodos y concentraciones comparables. Por el contrario, en este caso el efecto fue promotor (Tabla XXIII). Igualmente, los extractos de tallos susceptibles promovieron el CM mientras que los obtenidos de tallos tolerantes lo inhibieron. Se encontraron diferencias significativas entre los efectos producidos por extractos de plantas que exhibieron diferentes respuestas frente al patógeno, lo que indicaría la presencia de mecanismos bioquímicos en relación con diferencias en susceptibilidad entre grupos de individuos de una misma edad.

Con respecto a los extractos etanólicos, no parecerían estar relacionados con las diferencias en susceptibilidad, ya que no se encontraron diferencias entre grupos de individuos tolerantes y susceptibles (Tabla XXIII).

En cuanto al número de esclerocios por caja, en todos los casos en que se incorporaron extractos al medio basal se encontró un incremento significativo del mismo. Sin embargo, cabe destacar que el extracto proveniente de las plantas tolerantes produjo un número significativamente menor de esclerocios que aquellos obtenidos de plantas susceptibles o no inoculadas (Tabla XXIV).

111.2.4.4. Conclusiones

En todos los ensayos realizados se puso de manifiesto la presencia de mecanismos bioquímicos postinfeccionales en relación con las diferencias de susceptibilidad de las plantas de acuerdo con la edad en que son inoculadas. Dichos mecanismos también estarían relacionados con las diferencias entre individuos de una misma edad que presentan distintos grados de tolerancia a la enfermedad. Esto se concluyó como consecuencia del efecto que los distintos extractos produjeron sobre el CM in vitro. Una mayor tolerancia se relacionó siempre con un efecto inhibitor. Dicho efecto se manifestó a través de una reducción de la velocidad

Tabla XXIII: Efecto de extractos provenientes de la zona de interacción de plantas inoculadas que presentaron a campo distintos grados de tolerancia a la podredumbre basal. S₁: podredumbre incipiente; S₇: podredumbre avanzada. T: plantas no inoculadas (300 mg peso fresco inicial/ml) (% respecto al crecimiento sobre el medio basal)

	Acuoso	Extractos Etanólico	Clorofórmico
T	+ 42 ^a %	+ 3 ^a %	NR
S ₁	- 15 ^b %	- 20 ^b %	NR
S ₇	+ 23 ^c %	- 27 ^b %	NR

+: promoción; -: inhibición; NR: no realizado

Los valores son promedio de 6 repeticiones. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 5%. Las comparaciones son válidas dentro de cada columna.

Tabla XXIV: Número promedio de esclerocios por caja en medios con extractos acuosos obtenidos de plantas inoculadas, con podredumbre incipiente (S₁) y avanzada (S₇), y de plantas no inoculadas (T). C: medio control.

	C	Tratamiento		T
		S ₁	S ₇	
Nº promedio de escl/caja	0,33 ^a	0,67 ^b	1,17 ^c	1,0 ^c

Los valores son promedio de 6 repeticiones. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 5%.

del crecimiento del patógeno y del número de esclerocios formados. En algunos casos se produjo, además, un retardo del comienzo del crecimiento.

Los mecanismos mencionados actuarían, o estarían presentes, tanto en las plantas crecidas en cámara bioclimática como cultivadas a campo, a pesar de tratarse de materiales provenientes de distintas líneas.

Es posible que la magnitud o velocidad del desencadenamiento de estos mecanismos sea modulada por los factores del ambiente. Al disminuirse la longitud del período luminoso en el que crecieron las plantas se modificó la tolerancia en el estadio I (III.1.4.). Esto estuvo acompañado de una concomitante modificación del efecto de los extractos provenientes de este estadio sobre el CM.

Con respecto a las plantas susceptibles, se han encontrado evidencias acerca de la existencia de mecanismos de defensa, aún cuando no lo suficientemente desarrollados como para frenar la enfermedad. En los márgenes de las lesiones, en los que aún perduran células vivas, existiría una "lucha" activa entre ambos organismos que se reflejaría a través de la ausencia de un efecto promotor, similar al que producen tanto los tejidos extensamente colonizados como los tejidos sanos que aún no han tomado contacto con el patógeno. Esto coincidiría con la observación general acerca de que las diferencias entre susceptibilidad y tolerancia en una misma especie vegetal residen en diferencias en la magnitud, velocidad de producción y duración de los mecanismos de defensa, y no en diferencias cualitativas entre los mismos.

En cuanto a la existencia de mecanismos bioquímicos preinfeccionales los resultados han sido dispares. Los resultados variaron de acuerdo con el método de extracción y del material vegetal y las condiciones de cultivo empleadas. En un mismo material vegetal y con similares condiciones de crecimiento la presencia de estos mecanismos se manifestó al emplearse el método de extracción más drástico y prolongado (agua en ebullición y 12 hs de extracción). Sin embargo como se discutió oportunamente, el hecho de que el efecto inhibitor se encontrara en extractos de plantas sanas de todos los estadios parecería indicar la no relación con la defensa. Sería posible descartar artificios de extracción que explicaran la magnitud de este efecto inhibitor en planta sana, ya que los extractos de estas plantas crecidas a campo y las de susceptibles crecidas en cámara, obtenidos con igual método, promovieron el CM.

No se conocen antecedentes bibliográficos previos sobre los mecanismos de resistencia en girasol frente a esta enfermedad. Sin embargo se ha sugerido la existencia de mecanismos bioquímicos preinfeccionales en papa y cebolla atacados por S. sclerotiorum (Lumsden, 1979), si bien no han sido identificadas las sustancias involucradas.

Por otro lado, se ha encontrado que en hojas de trébol ciertas isoflavonas preformadas como la 7OH, 4 metoxi-isoflavona poseen una actividad antifúngica frente a S. trifoliorum (Virtanen et al., 1958; Debnan y Smith, 1976).

III.3 Compuestos fenólicos en relación con los mecanismos bioquímicos de resistencia

III.3.1. Introducción

En el punto III.2 se expusieron aquellos experimentos cuyo resultados permitieron demostrar la existencia de mecanismos bioquímicos en relación las diferencias en susceptibilidad entre los distintos estadios fenológicos del girasol, y entre grupos de individuos dentro de un único estadio.

En el presente capítulo se presentan los ensayos realizados a fin de profundizar en el conocimiento de la naturaleza química de los compuestos relacionados con tales mecanismos.

Como se mencionara en los antecedentes bibliográficos, los compuestos antifúngicos pre o postinfeccionales pueden pertenecer a diferentes grupos químicos (I.3.3.3.6).

Debido a la amplia gama de posibilidades que se presentaban para el estudio de todas las sustancias eventualmente involucradas se decidió restringir aquel al análisis de los compuestos fenólicos en relación con los mecanismos de defensa.

Los aspectos que fundamentaron tal decisión fueron:

- Las lesiones de las plantas tolerantes: edad I, II_T y IV se caracterizaron por poseer bordes limitados castaño-rojizo oscuros, ser superficiales y afectar únicamente las capas corticales del tallo (cfr. III.1.). Estos sugería la relación de los pigmentos melanínicos (polímeros de dihidroxifenoles) o sus precursores con la tolerancia. Cabe destacar que en numerosas enfermedades parasitarias esos polímeros intervienen en la delimitación de las lesiones necróticas (Bell, 1981).
- Los estudios realizados en tallos de girasol sanos citan la ocurrencia del ácido clorogénico y sus isómeros como principales compuestos fenólicos, relacionándolos con la síntesis de lignina, control hormonal, alelopatía, etc (Koeppel et al., 1969; 1970; 1976).
- Las observaciones preliminares de cortes transversales de tallos, en presencia de reactivos histoquímicos para la localización de dihidroxifenoles, permitieron conocer que estos se localizaban en las zonas periféricas del tallo. La localización de un compuesto supuestamente relacionado con la defensa en las zonas de infección es un requisito indispensable que debe ser demostrado para sostener tal afirmación.

Una gran proporción de compuestos antifúngicos, ya sean pre o postinfeccionales, son de naturaleza fenólica (Friend, 1977).

Los objetivos que se plantearon en esta etapa del trabajo son:

- a) Estudiar la eventual acumulación de los compuestos fenólicos en tallos de girasol de las distintas edades, o grupos de plantas dentro de una misma edad, como consecuencia de la inoculación con S. sclerotiorum.
- b) Investigar la existencia de una relación entre el incremento de estos compuestos y el grado de tolerancia al hongo.
- c) Identificar los compuestos inhibidores eventualmente hallados.
- d) Cuantificar los compuestos inhibidores in vivo y determinar sus umbrales mínimos de inhibición.
- e) Localizar histoquímicamente a los fenoles en los tejidos testigo e inoculados a fin de conocer si existen diferencias entre estadios y confirmar su ubicación en las zonas de infección.
- f) Realizar un análisis cualitativo comparado de los fenoles presentes en tallos tolerantes de H. annuus y H. tuberosus a fin de conocer similitudes o diferencias en los componentes de la defensa.

El término "compuestos fenólicos" involucra un amplio espectro de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos sustituyentes. Generalmente se encuentran en los vegetales combinados con azúcares (glucósidos) o como ésteres de ácidos orgánicos. Esto los hace más solubles y transportables en la planta que los fenoles libres. Generalmente se los localiza en el interior de las vacuolas (Ribereau-Gayon, 1972).

Las obras editadas por Harborne (1973) y Swain et al. (1977) suministran una visión general de sus estructuras, aislamiento, identificación, distribución natural, metabolismo, biosíntesis y función patológica. Las revisiones de Friend (1977) y Kosuge (1969), y el "Simposio sobre Fenoles en las Plantas Sanas y Enfermas" (Pridham, 1960) aportan aspectos generales sobre sus roles en la defensa. Además de su relación con la misma se hallan vinculados con funciones estructurales (lignina) de atracción (flavonoides), de alelopatía, regulación y reserva.

III.3.2. Determinación del tiempo de extracción de los fenoles solubles.

Los antecedentes bibliográficos demostraron que los principales fenoles solubles presentes en tallos de girasol son los distintos ácidos cafeoilquínicos (Koepe et al., 1970 etc), compuestos de amplia distribución en el reino vegetal. El más abundante de ellos, ácido clorogénico, es un ester del ácidos cafeico y el ácido quínico (ácido 3 cafeoilquínico) (Figura 25). Sus isómeros son: el ácido criptoclorogénico (4 cafeoilquínico), el neoclorogénico (5 cafeoilquínico) y el isoclorogénico (mezcla de los ácidos 3,4; 4-5; y 3-5 dicafeoilquínicos) (Grodzinska-Zachwieja et al., 1967) (Figura 25).

Un estudio referido a la solubilidad de diversos derivados hidroxicinámicos (Voigt, 1960) muestra que el ácido clorogénico (clo.) es soluble en los solventes bastante polares como alcoholes ligeros, la acetona y eventualmente el agua.

Dichos solventes son los frecuentemente empleados en las técnicas generales para la extracción de compuestos fenólicos del material vegetal (Nichiforesco et al., 1965). En todos los casos, la presencia de una cierta proporción de agua (20% en general) es indispensable para obtener un buen rendimiento. Esto se debe a que durante la molienda pueden formarse diversas uniones (puentes de hidrógeno o uniones covalentes, según el pH), con las proteínas. El agua favorece la ruptura de dichos ligamientos.

A fin de determinar el tiempo necesario para la extracción exhaustiva de los fenoles solubles, se ensayaron distintos tiempos de contacto entre el material molido y metanol 80% en ebullición.

Como puede observarse en la Tabla XXV, al cabo de 3 hs se ha extraído el 99% del total de fenoles, independientemente del origen del material (zona del tallo, estado sanitario, y grado de susceptibilidad). Por lo tanto se decidió emplear tres períodos sucesivos de una hora para el logro de una extracción eficiente y comparable.

III.3.3. Compuestos fenólicos totales

III.3.3.1. Estudios cuantitativos y relación entre la concentración de fenoles en los extractos y el efecto de los mismos sobre el crecimiento micelial (CM)

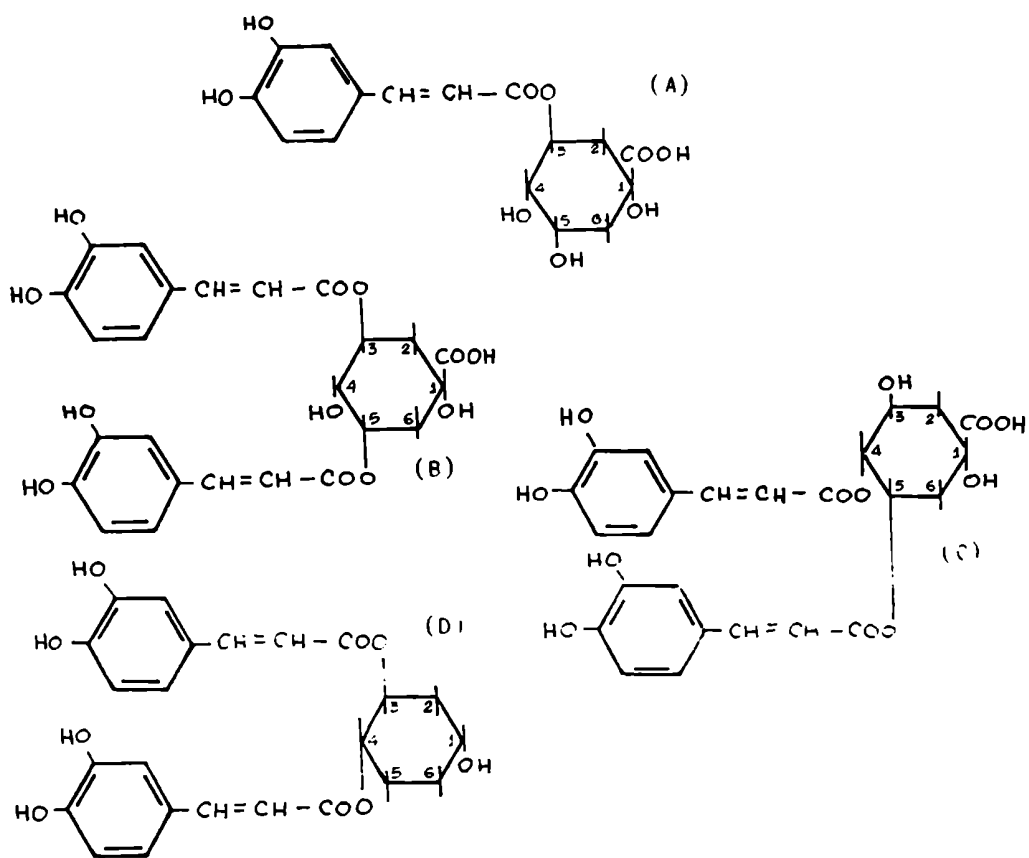


Figura 25: Estructuras de los ácidos cafeoilquínicos más abundantes en los tallos. a: ácido 3-cafeoilquínico (ácido clorogénico), b: ácido 3,5-dicafeoilquínico; c: ácido 4,5-dicafeoilquínico y d: ácido 3,4-dicafeoilquínico (el ácido isoclorogénico está constituido por una mezcla de las estructuras b, c y d).

Tabla XXV: Proporción de fenoles solubles totales (%) extraídos con distintos tiempos de ebullición del material vegetal en metanol 80%.

Duración (hs)		Extracción					
		1a 1	2a 1	3a 0,5	4a 0,5	5a 1	6a 0,5
	Zona del tallo						
Testigo (no inoc.)	L	73	21	5	1		
	SA	73	22	4	2		
Inoc. sus- ceptible	L	85	10	3	1,3	0,7	
	SA	85	11	2,7	0,6	0,7	
Inoc. tole- rante	L	89	7,3	1,7	1,1	0,9	
	SA	87	10,6	1,6	0,8	-	

L: Zona del tallo que comprende toda la lesión, o tejidos similares en las plantas testigo.

SA: Zona de tejidos sanos adyacentes al margen superior de las lesiones (1 cm de longitud) o similares en las plantas testigo.

III.3.3.1.1. Plantas cultivadas en cámara bioclimática

III.3.3.1.1.1. Análisis al 5º día de la inoculación

Contenido de fenoles en plantas sanas versus enfermas

En un primer análisis de los datos solo se compararon los resultados de acuerdo con la edad y el estado sanitario de las plantas (Tabla XXVI). Se detectó un incremento significativo de los fenoles en los tallos inoculados de los tres estadios, pero no se hallaron diferencias significativas entre ellos.

El contenido de fenoles en las plantas testigo del estadio IV fue menor que en los otros estadios.

Contenido de fenoles en las distintas zonas de los tallos testigo e inoculados

En este análisis se discriminaron las distintas zonas de los tallos así como las dos subpoblaciones del estadio II que se delimitaron y describieron en el punto III.1.4.2. Interesaba conocer en que zona/s se producía la acumulación fenólica así como si esta era localizada o sistémica (inducida en toda la planta).

Para ello se analizó individualmente el contenido de fenoles totales en las zonas de las "lesiones" (L), "sanas adyacentes" (SA) (segmentos de tallo de 1 cm de longitud a partir del margen superior de la lesión), y del "primer nudo" (PN) (segmento de tallo de 1 cm de longitud tomado por encima del primer nudo verdadero) de las plantas inoculadas y tejidos similares de las plantas testigo (Figura 5). Los individuos se cosecharon al 5º día después de la inoculación.

En las plantas tolerantes (I, II_T y IV), la acumulación fue significativa en las zonas (L) y (SA); no se encontraron diferencias entre los estadios (Figura 26). Únicamente en el estadio IV se verificó un incremento significativo de los fenoles en la zona PN (Tabla XXVII).

El contenido de fenoles en las zonas L de los individuos susceptibles fue siempre significativamente menor que en las de los tallos tolerantes; en algunos experimentos fue mayor que en las plantas testigo (Tabla XXVIII) (Exp. 2) en tanto que en otros no existieron diferencias (Tabla XXVIII) (Exp. 1). La concentración fenólica en las zonas SA fue mayor (Figura 26), o similar (Tabla XXVIII) (Exp.1) a la de tejidos análogos de los testigos. En la zona (PN) nunca se verificó incrementos de fenoles (Tabla XXVII).

Tabla XXVI: Concentración de fenoles totales solubles en metanol en tallos sanos e inoculados de distintas edades (mg de fenoles/gr de peso fresco inicial).

	I	Estadio II	IV
Testigo	4,58 ^a	4,71 ^a	3,38 ^b
Inoculadas	14,09 ^c	10,72 ^c	9,76 ^b

Los valores son promedios de 20-24 repeticiones e incluyen a las zonas (L) y (SA). Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas al 5%.

I: estadio vegetativo; II: estadio de botón floral cerrado y IV: estadio de botón floral abierto.

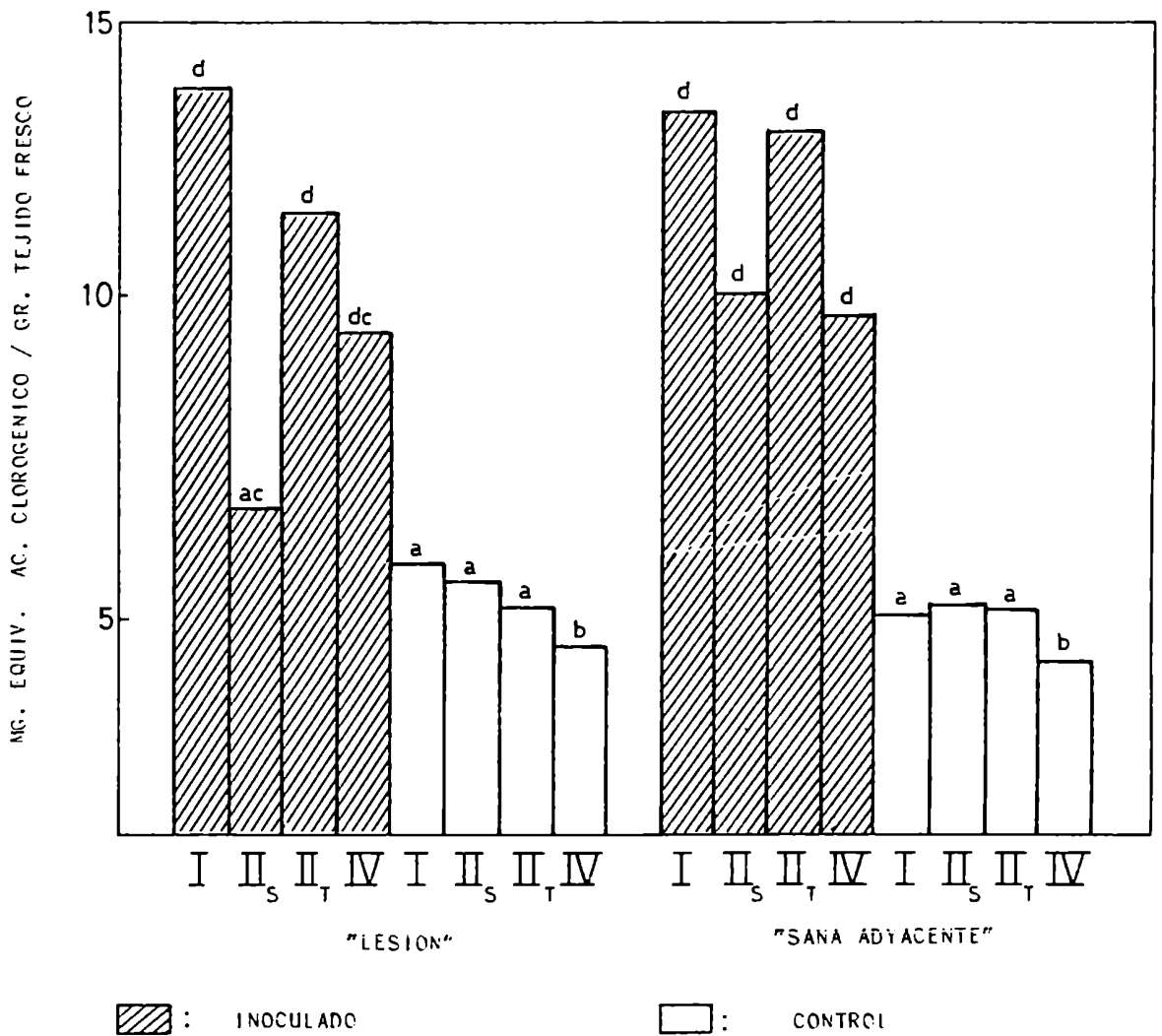


Figura 26: Contenido de fenoles totales en distintas zonas de tallos inoculados y tejidos similares de tallos sanos, de acuerdo con la edad de inoculación. I: vegetativo; II_S: individuos susceptibles en estadio de botón floral cerrado; II_T: individuos tolerantes en estadio de botón floral cerrado; y IV: botón floral abierto. Los valores son promedio de 12 repeticiones. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas del 5%.

Tabla XXVII: Contenido de fenoles totales solubles en metanol en las zonas de "primer nudo" y tejidos similares de tallos testigo, de distintas edades (mg de fenoles/gr de peso fresco inicial).

	I	Estadio II	IV
Testigo	0,75 ^a	2,5 ^a	2,5 ^a
Inoculado	2,0 ^a	2,7 ^a	8,0 ^b

Cada valor es promedio de 8 repeticiones. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 1%.

I: estadio vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

Tabla XXVIII: Contenido de fenoles totales solubles en metanol en distintas zonas de tallos inoculados y testigos de distintas edades (mg de fenoles/gr peso fresco inicial).

Experimento	Tratamiento	Estadio		
		I	II _S	II _T
1	testigo (L)	1,36 ^a	1,8 ^a	1,8 ^a
	testigo (SA)	1,30 ^a	1,20 ^a	1,20 ^a
	inoculado (L)	7,58 ^b	2,76 ^a	6,72 ^b
	inoculado (SA)	4,42 ^b	2,10 ^a	5,14 ^b
2	testigo (L)	0,6 ^a	0,96 ^a	0,96 ^a
	inoculada (L)	8,1 ^c	3,55 ^b	6,40 ^c

Los valores son promedio de 3-6 repeticiones. Las comparaciones solo son válidas dentro de cada experimento; valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 1%. (L): lesiones; (SA): sanas adyacentes; I: vegetativo; II_S: plantas susceptibles con botón floral cerrado y II_T: planta tolerantes con botón floral cerrado.

Con referencia a las plantas testigo no se detectaron diferencias en el contenido fenólico para las distintas alturas del tallo estudiadas (Figura 26) (Tabla XXVIII). Los resultados obtenidos permiten concluir que:

Como consecuencia de la infección se produce una acumulación significativa de fenoles en las L y SA de las plantas tolerantes. En el estadio IV esto también ocurre en PN.

- En las L de individuos susceptibles (II_S) la acumulación de fenoles es menor que en la misma zona de individuos tolerantes, aunque puede no ocurrir. En las SA, dicha acumulación es semejante a la que se observa en las L de las plantas tolerantes, pero también puede no producirse.
- Un mayor grado de tolerancia se relacionó con una mayor acumulación de los fenoles en las zonas de infección. Al representar la inversa del contenido de fenoles en las lesiones, en función de la longitud de las mismas (independientemente de la edad) se encontró una correlación significativa entre ambas variables ($r: 0,6$) ($P: 0,01$) (Figura 27).

Efecto de los extractos metanólicos sobre el crecimiento micelial (CM)

El análisis del contenido de fenoles demostró una respuesta a la infección que se relacionó con el grado de tolerancia a la enfermedad. La pregunta que surgió de inmediato fue si los extractos caracterizados por distintas concentraciones de fenoles presentan a su vez efectos diferenciales sobre el CM. Con ese propósito se realizaron bioensayos con los extractos provenientes de las distintas zonas de tallos testigo e inoculados de las 3 edades.

Los extractos provenientes de las zonas L de los tallos de los estadios I, II_T y IV inhibieron por igual el CM. Aquellos provenientes de las L de los tallos susceptibles (II_S), en los cuales no se había verificado incremento fenólico, no modificaron significativamente el CM respecto al obtenido con el medio de cultivo basal (Figura 28).

Los extractos obtenidos de los tejidos SA, en los que se produjo acumulación, inhibieron el CM independientemente de la edad del hospedante (Figura 28). A igualdad de concentración, sin embargo, los efectos inhibidores provocados por los extractos de las zonas SA fueron significativamente menores que los provocados por los obtenidos de las lesiones ($P:0,05$).

Los extractos provenientes de la zona del PN del estadio IV inoculado, en los cuales se había verificado un incremento fenólico, inhibieron el CM (Tabla XXIX).

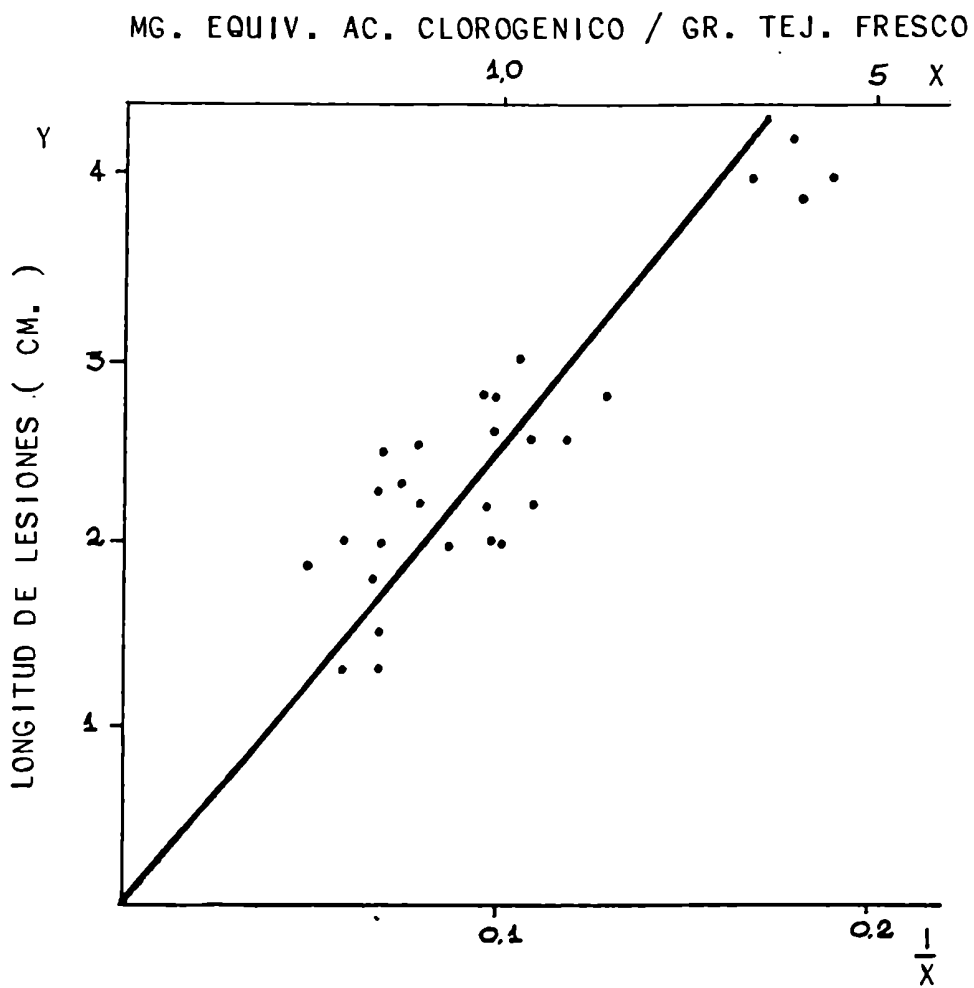


Figura 27: Longitud de las lesiones en función de la inversa del contenido de fenoles totales ($1/x$) en las mismas, independientemente de la edad de inoculación. Índice de correlación: 0,6 (significativo al 1%).

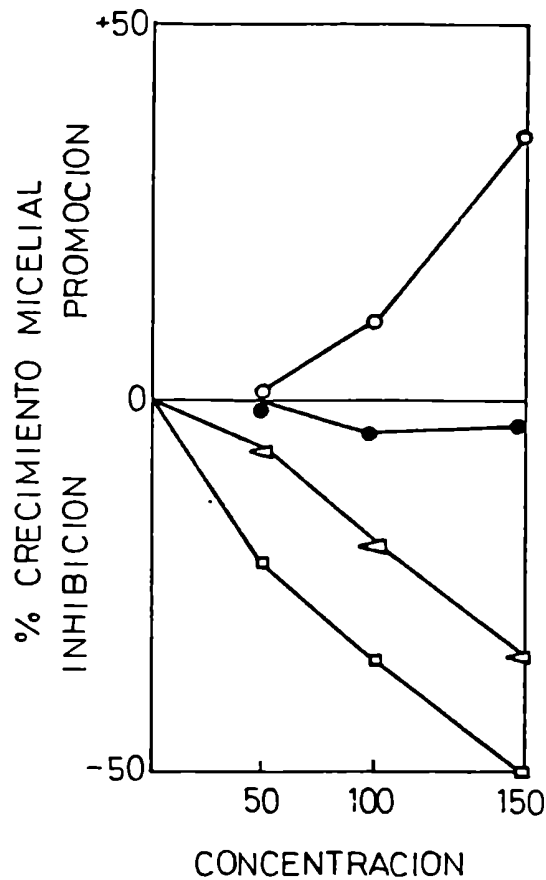


Figura 28: Efecto de distintas concentraciones de extractos metanólicos (mg de peso fresco de tejido inicial/ml), sobre el crecimiento micelial al 7º día después de la inoculación (expresado como % del crecimiento en medio basal sin extractos). 0: extractos de plantas sanas independientemente de la edad y zona del tallo; o: extractos de lesiones de individuos susceptibles en estadio de botón floral cerrado (II_S, máxima susceptibilidad). Δ: extractos de zonas "sanas adyacentes" a las lesiones, independientemente de la edad (I, II_S, II_T y IV) y □: extractos de lesiones de tallos tolerantes (I, II_T y IV). Cada valor es promedio de 6 repeticiones.

Tabla XXIX: Efecto de extractos metanólicos provenientes de la zona del 'primer nudo' (PN) de tallos testigo e inoculados de edad IV, sobre el CM al 7º día de la inoculación (% respecto al crecimiento sobre el medio basal).

Estadio	Zona	Efecto sobre el CM
IV testigo	PN	+ 7
IV inoculado	PN	-29*

IV: estadio de botón floral abierto. +: efecto promotor; -: efecto inhibidor;

*: acumulación de fenoles.

En cuanto a los extractos provenientes de los tallos testigo, estos promovieron el CM. Dicho efecto fue similar para todas las edades (Figura 28).

En todos los casos, los efectos (fueran promotores o inhibidores) se incrementaron al aumentar la concentración de extracto en el medio de cultivo (Figura 28). Es posible concluir que siempre que se detectó un incremento significativo de fenoles, el efecto de los extractos fue inhibidor independientemente de la edad del hospedante y la zona del tallo.

III.3.3.1.1.2. Contenido fenólico en plantas de edad II a distintos tiempos después de la inoculación.

En los estadios tempranos de las infecciones, los cambios metabólicos que se producen como consecuencia de las mismas son similares a aquellos propios del daño instantáneo, como cuando ocurren heridas mecánicas. En los estadios tardíos los eventos metabólicos involucran cambios característicos, propios del daño continuo (Uritani, 1979).

A fin de lograr la comprensión de los distintos procesos relacionados con la infección se han realizado estudios que toman como sistema experimental a plantas dañadas mecánicamente (Uritani, op. cit.). Dichas alteraciones, que ocurren tanto en los tejidos dañados como en los adyacentes a las superficies cortadas, incluyen un incremento en la respiración debido al aumento del número de mitocondrias y estimulación de enzimas utilizadoras de ATP, tales como la síntesis de RNA y proteínas (Uritani y Stahmann, 1961). Los requisitos adicionales para tal respiración son un consumo continuo de carbohidrato y un suplemento adecuado de ADP, ATP, NAD y NADP (Matsushita y Uritani, 1974).

Otra alteración conocida en respuesta a los cortes es la producción de fenoles luego de 12 hs de fase de retardo (Kosuge, 1969). La producción de los mismos permanece lineal por dos días y luego la velocidad disminuye (Minamikawa y Uritani, 1964). En el caso de heridas, dichos compuestos han sido relacionados con la síntesis de ligninas y suberinas que intervienen en la constitución de los tejidos de cicatrización (Mc Clure, 1967; Crafts et al., 1962). Se ha sugerido que una hormona de heridas se liberaría a partir de las células dañadas incrementando el metabolismo de los tejidos sanos adyacentes. Sin embargo

esta hipótesis no ha sido comprobada.

Una vez concluida la etapa temprana de la infección se producirán diferentes patrones dependiendo, de la particular interacción hospedante-patógeno.

Con el propósito de conocer la cinética de la producción de fenoles se realizó un estudio secuencial con plantas del estadio II. Los fenoles totales se cuantificaron en los extractos metanólicos obtenidos de las lesiones de tallos cosechados al 3°, 4°, 5° y 7° día después de la inoculación.

Como los síntomas externos, en los individuos tolerantes y susceptibles (II_T y II_S) al 3° y 4° día, no se diferenciaban no fue posible discernir a priori cuales pertenecían a uno u otro subgrupo (III.1.4.2.). Por ello, el criterio empleado fue reunir, dentro de cada muestra, aquellos individuos en los cuales las lesiones eran más profundas y alcanzaban la médula con aquellos en los que los haces vasculares se mostraban oxidados (castaños). Como dichos síntomas son característicos de la susceptibilidad (capítulos III y VI) los individuos que los presentaban se incluyeron bajo la denominación II_S . El resto, que se caracterizó por poseer lesiones muy superficiales, se denominó II_T .

En las plantas del grupo II_S cosechadas al tercer día, el contenido de fenoles fue mayor que en las plantas testigo y no difirió del de los individuos cosechados al 4° y 5° día (Figura 29).

El contenido de fenoles en las lesiones de las plantas II_T fue también siempre mayor que en las testigo, incrementándose en función del tiempo de la inoculación de manera exponencial ($r^2 = 1,0$), hasta el 5° día. No se hallaron diferencias significativas ni entre el 3° y 4° día ni entre el 5° y 7° día. Por el contrario se verificó un incremento altamente significativo entre el 4° y 5° día (Figura 29).

Los resultados obtenidos sugieren que el comportamiento de las subpoblaciones susceptible y tolerante dentro de la edad I sería similar hasta el 4° día. En tal sentido se encuentra un paralelismo con respecto al desarrollo de las lesiones (ver gráfico anexo a figura 29) cuyas longitudes exhiben sus máximas diferencias al 5° día. Los datos parecerían indicar que en las plantas del estadio II_T se alcanza la concentración de fenoles apropiada para detener al patógeno, o hacer baja la velocidad de su crecimiento, mientras que en el II_S esto no ocurriría.

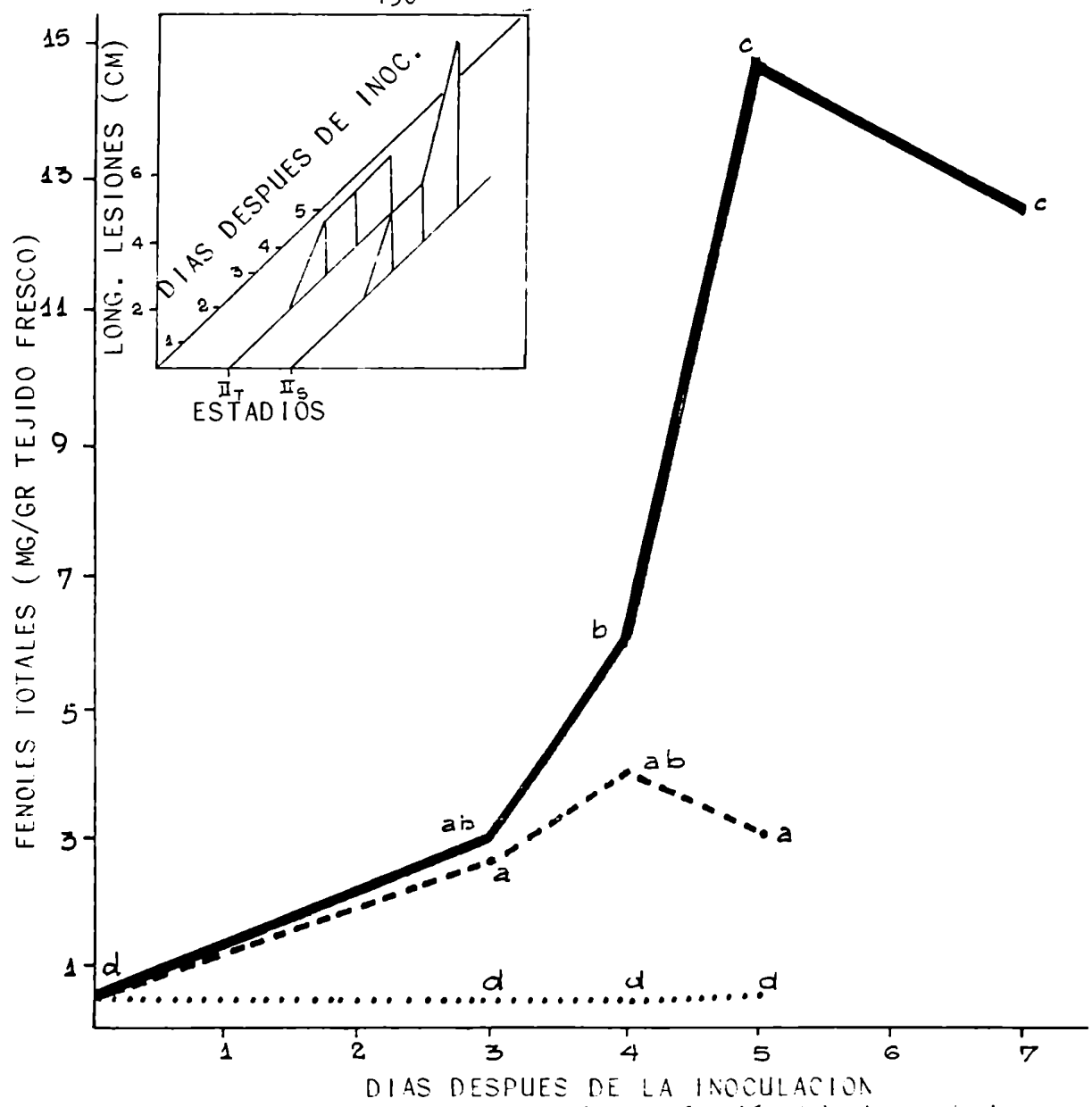


Figura 29: Contenido de fenoles totales en función del tiempo de inoculación en tallos "susceptibles" (---) y tolerantes (—) del estadio II, y en tallos sanos (...). Los valores son promedio de 5 repeticiones. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 1%.

Uritani (1979), al estudiar la interacción batata-Ceratocystis fimbriata encontró que un día después de la infección se produce en los tejidos enfermos un incremento en la producción de fenoles, respiración, consumo de carbohidratos, activación de ciertas enzimas mitocondriales y formación de peroxidasas. La velocidad de producción de dichos procesos muestra una curva bifásica, la que es interpretada por el autor como resultado de un estado transitorio entre las respuestas primarias y secundarias a la infección.

III.3.3.1.2. Plantas cultivadas a campo

III.3.3.1.2.1. Grupos de individuos susceptibles y tolerantes de una misma edad.

Con el objetivo de conocer si en plantas cultivadas a campo también se detectaba una acumulación postinfeccional de fenoles, y si esta se relacionaba con la tolerancia a la podredumbre basal, se utilizaron plantas de distintas líneas que estaban siendo seleccionadas por su resistencia a la mencionada enfermedad. Dichas plantas, cultivadas en el campo experimental de Cargill S.A. en Pergamino (Pcia. de Bs.As.), en la campaña 1982/1983 fueron inoculadas experimentalmente en la primera semana de floración (diámetro promedio del capítulo de 5 cm), y cosechadas a los 35 días después de la inoculación. Posteriormente, fueron separadas en grupos de individuos susceptibles y tolerantes. Los tallos transportados en frío hasta el laboratorio se fraccionaron y extrajeron según la metodología descrita en el punto II.2.5.2.2.1. Los fenoles totales se cuantificaron en las zonas de "lesiones" (L) y "sanas adyacentes" (SA) de las plantas inoculadas y en tejidos similares de plantas testigo.

Los tallos de las plantas susceptibles se presentaron huecos, y las lesiones que exhibían poseían una longitud promedio de 34 cm. En las plantas tolerantes el tallo estuvo firme y las lesiones poseyeron una longitud significativamente menor, con un valor promedio de 13 cm.

Como puede observarse en la Tabla XXX se encontró una relación entre la tolerancia y el incremento postinfeccional de los fenoles. En los individuos tolerantes este fue significativo en las zonas L; por el contrario esto no ocurrió en los individuos susceptibles. No se detectó acumulación en las zonas SA independientemente del grado de tolerancia.

Tabla XXX: Contenido de fenoles totales en extractos metanólicos provenientes de zonas de lesiones (L) y tejidos sanos adyacentes (SA) de individuos susceptibles y tolerantes, cultivados a campo (mg. de fenol/gr de peso fresco de tejido inicial extraído); efecto de dichos extractos sobre el crecimiento micelial al 6º día de la inoculación (% respecto al medio basal) (150 mg de peso fresco inicial/ml de medio).

	Zona	Testigo (no inoculado)	Inoculado Tolerante	Inoculado Susceptible
Fenoles	(L)	1,50 ^a	4,97 ^b	2,20 ^a
	(SA)	1,23 ^a	1,93 ^a	1,95 ^a
Efecto sobre CM	(L)	-10 ^a	-56 ^b	-30 ^c
	(SA)	NR	0 ^a	0 ^a

Cada valor es promedio de 3-5 repeticiones. Promedios seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 5%. Las comparaciones son válidas entre filas y columnas, dentro de cada variable. -: inhibición. NR: no realizado.

Al estudiar el efecto de los extractos metanólicos sobre el CM se encontró que aquellos provenientes de las L lo inhibieron significativamente. Sin embargo la inhibición producida por los extractos de los individuos tolerantes fue significativamente mayor que la producida por los extractos de los individuos susceptibles. Los extractos de los testigos y SA de las inoculadas no afectaron el CM (Tabla XXX).

III.3.3.1.2.2. Contenido de fenoles de acuerdo con la zona de inoculación

En el punto III.1.3 se describió un ensayo en el que se comparó el comportamiento del híbrido Super 400 (S 400) y de una línea madre del mismo (LM), al ser inoculados en distintas zonas del tallo. Los resultados habían indicado que mientras S 400 era susceptible independientemente de la zona de inoculación, LM era tolerante si se la inoculaba en el hipocótilo (H) y susceptible si se la inoculaba en el epicótilo (E).

Surgió como interrogante si dichas diferencias de respuesta al patógeno se relacionaban con diferencias en la acumulación fenólica. Para ello, se determinó el contenido de fenoles en las lesiones de los individuos que habían sido evaluados en el ensayo descrito en el punto III.1.3.

Como se observa en la Tabla XXXI los mayores contenidos fenólicos se encontraron en la LM respecto al S 400; a su vez dentro de esta los individuos inoculados en el H presentaron las concentraciones más altas. No se hallaron diferencias de concentración entre las distintas zonas de inoculación en S 400. El efecto de los extractos sobre el CM guardó una relación directa con el contenido fenólico, es decir que a mayor concentración mayor efecto inhibitor (Tabla XXXI).

III.3.3.1.3. Conclusiones

La aceleración de la síntesis de los compuestos fenólicos luego de la infección por un agente patógeno es un fenómeno conocido en numerosos hospedantes y que se ha relacionado muy frecuentemente con la resistencia (Horsfall *et al.*, 1959; Pridham, 1960; Kosuge, 1969; Friend, 1977; Bell, 1981, etc). Generalmente existe relación directa con la magnitud de tal incremento, y en especial entre

Tabla XXXI: Concentración de fenoles totales (mg de fenol/gr de peso fresco de tejido inicial) en las lesiones de tallos de una línea madre del híbrido Super 400 (LM) y de este híbrido (S 400) inoculados en el hipocótilo (H) y epicótilo (E); efecto de los correspondientes extractos metanólicos sobre el crecimiento micelial al 6º día de la inoculación (% respecto al medio basal) (300 mg de PF inicial/ml medio).

		Zona de inoculación	
		E	H
Fenoles	LM	9,3 ^a	10,7 ^b
	S 400	3,0 ^c	3,7 ^c
Efecto sobre CM	LM	-58 ^a	-90 ^b
	S 400	-33 ^c	NR

inhibición; NR: no realizado.

Cada valor es promedio de 3-5 repeticiones. Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 5%. Las comparaciones son válidas entre filas y columnas, dentro de cada variable.

la velocidad de la síntesis y el grado de resistencia. Tal es el caso de Helminthosporium carbonium en papa (Kuč et al., 1956; Sclerotinia frutigena en manzano (Byrde et al., 1960) Colletrotichum graminicola en maíz (Hammerschmidt et al., 1977) y Verticillium albo-atrum en frutilla (Okasha et al., 1968).

Su acción se ejerce a través de la inhibición del crecimiento micelial, la inhibición de la germinación de las esporas fúngicas, o el bloqueo de las enzimas extracelulares de los patógenos (Byrde, 1957; Dabler et al., 1969; Patil et al., 1967; Kritzman et al., 1980; Haars et al., 1981, etc).

Los antecedentes de este tipo en girasol son muy escasos. Cohen e Ibrahim (1975) encontraron que la escopoletina se incrementaba en las porciones superiores de los tallos de girasol inoculados con Plasmopara halstedii, al igual que en las hojas. El ácido clorogénico al comienzo aumentaba y luego disminuía por debajo de los niveles hallados en las plantas sanas. Sin embargo, la alteración de los contenidos de los mencionados fenoles en esta interacción no se relacionaría con la defensa sino con alteraciones en el control hormonal, las que llevan a la fuerte inhibición del alargamiento del tallo, síntoma típico de la mencionada interacción. Por otro lado, los fenoles totales y ortodihidroxifenoles aumentaron en las zonas de halo y prehalo, y disminuyeron en las zonas necróticas de las lesiones foliares producidas por Alternaria helianthi (Bhas-karan y Kandaswamy, 1978).

Los resultados presentados en este punto permiten concluir que la tolerancia se caracteriza por la acumulación postinfeccional de los compuestos fenólicos. Este fenómeno ocurre tanto en individuos en estadios tolerantes (III.3.3.1.1.1.), en grupos de individuos resistentes dentro de un estadio susceptible (III.3.3.1.2.1.) y en tejidos tolerantes de hospedantes en estadio de mayor susceptibilidad (III.3.3.1.2.2.). Las concentraciones de fenoles alcanzadas en los mismos son siempre significativamente mayores que en los individuos o tejidos susceptibles. Esta respuesta, a su vez, sería independiente de las condiciones de cultivo de las plantas y de los materiales empleados (por lo menos bajo las condiciones de trabajo utilizadas).

A medida que aumenta el contenido de fenoles en los extractos metanólicos se incrementa el efecto inhibitor que estos poseen sobre el CM.

Con respecto a la naturaleza dinámica de la defensa Bell (1980) propone varios modelos (Figura 30). Según este autor la lucha entre el patógeno y el hospedante puede imaginarse como una competencia deportiva en la que los contrincantes

ponen en juego su fuerza, rapidez, velocidad y resistencia. Como ocurre en dicho caso la magnitud de cada uno de estos elementos de cada deportista adquirirá una importancia relativa al contrastarse con los correspondientes del contrincante. Haciendo un paralelismo con las interacciones huésped-patógeno es el balance de la dinámica de la colonización secundaria en relación con la dinámica de la defensa el que determinará el grado de tolerancia o susceptibilidad a la enfermedad.

En el huésped tolerante el conjunto de todos los factores de resistencia postinfeccional se dan más rápidamente, se inician antes o tienen una mayor duración que en el susceptible. A esto puede sumarse un mayor grado de tolerancia preinfeccional (plateau de las curvas) (Figura 30).

Si bien el esquema propuesto por Bell (op. cit.) es muy amplio y considera en su conjunto todos los componentes de la defensa se considerará los resultados del ensayo cinético de la acumulación de fenoles en términos del mismo partiendo de la suposición de que estos compuestos intervengan en los mecanismos de resistencia.

Las diferencias cuantitativas entre las subpoblaciones II_S y II_T , en el ensayo descrito en III.3.3.1.1.2 permite la formulación de una serie de hipótesis de trabajo:

- a) Si se considera que en esta interacción se dan una respuesta primaria como consecuencia del daño celular y una secundaria inducida por el patógeno, podría existir una falta de respuesta secundaria en II_S (¿falta de condiciones para que se libere o produzca un inductor patogénico?).
- b) Otra posibilidad sería que la síntesis fenólica no contine más allá del 3° día en II_S , o lo haga a menor velocidad. Las concentraciones inhibidoras no se alcanzarían a tiempo para frenar el crecimiento fúngico; el hongo crecería colonizado los tejidos, metabolizando los fenoles y evitando su acumulación. Sin embargo la síntesis de estos compuestos no se vería impedida en las zonas SA donde continuaría la acumulación. Esto podría deberse a variaciones en la velocidad de síntesis entre II_S y II_T o al efecto de un bloqueante de origen patogénico que interfiera en la síntesis de fenoles en II_S , como ocurre en la interacción papa-Phytophthora compatibles (Currier, 1981).

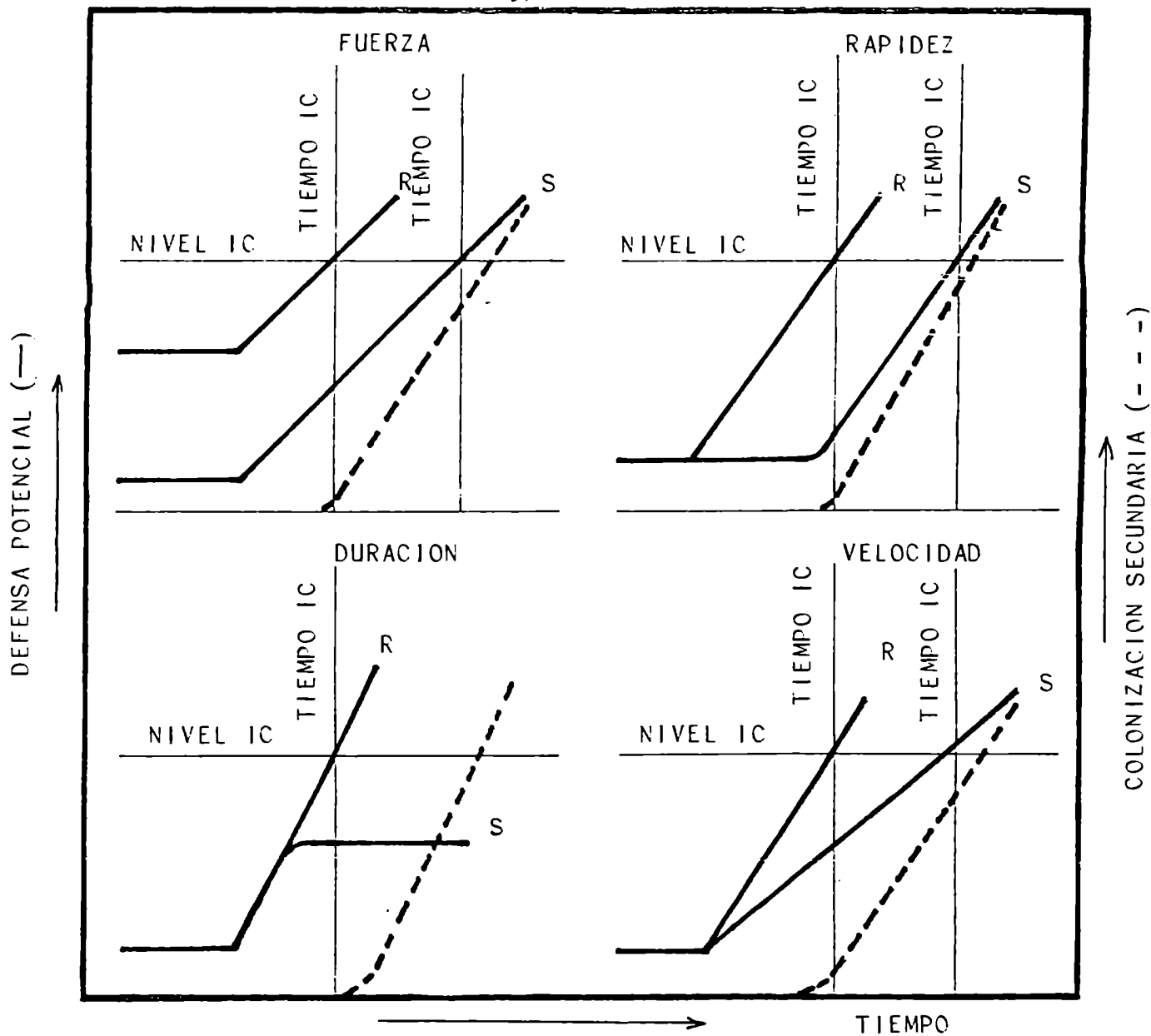


Figura 30: Modelo propuesto por Bell (1980), que muestra las relaciones temporales entre la colonización secundaria potencial de un patógeno y la defensa potencial del hospedante. Los niveles y tiempo IC son aquellos en los que ocurre la inhibición completa de la enfermedad, en los sitios donde se produjo la infección e indujo la defensa post infeccional. (- - -) colonización secundaria relativa, como extensión hifal o liberación de conidios en el interior de los vasos xilemático desarrollada más allá del sitio de infección original, (—) acumulación de los componentes de la defensa. El plateau inicial representa a los componentes constitutivos y las pendientes de las curvas la producción de componentes inducidos como consecuencia de la infección en interacciones resistentes (R) y susceptibles (S).

- c) La existencia de diferencias cualitativas en los fenoles entre individuos permitiría una metabolización de estos compuestos en II_5 .
- d) Fallas en la traslocación de los fenoles desde SA impedirían su acumulación en L. Esto podría deberse a la disminución en la permeabilidad celular que, según Hancock (1972), ocurre en las zonas adyacentes a las lesiones.
- e) Una mayor estimulación del crecimiento patogénica en II_5 permitiría una mayor metabolización de los fenoles en dicho estadio.

III.3.3.2. Estudios cualitativos

III.3.3.2.1. Plantas cultivadas en cámara bioclimática

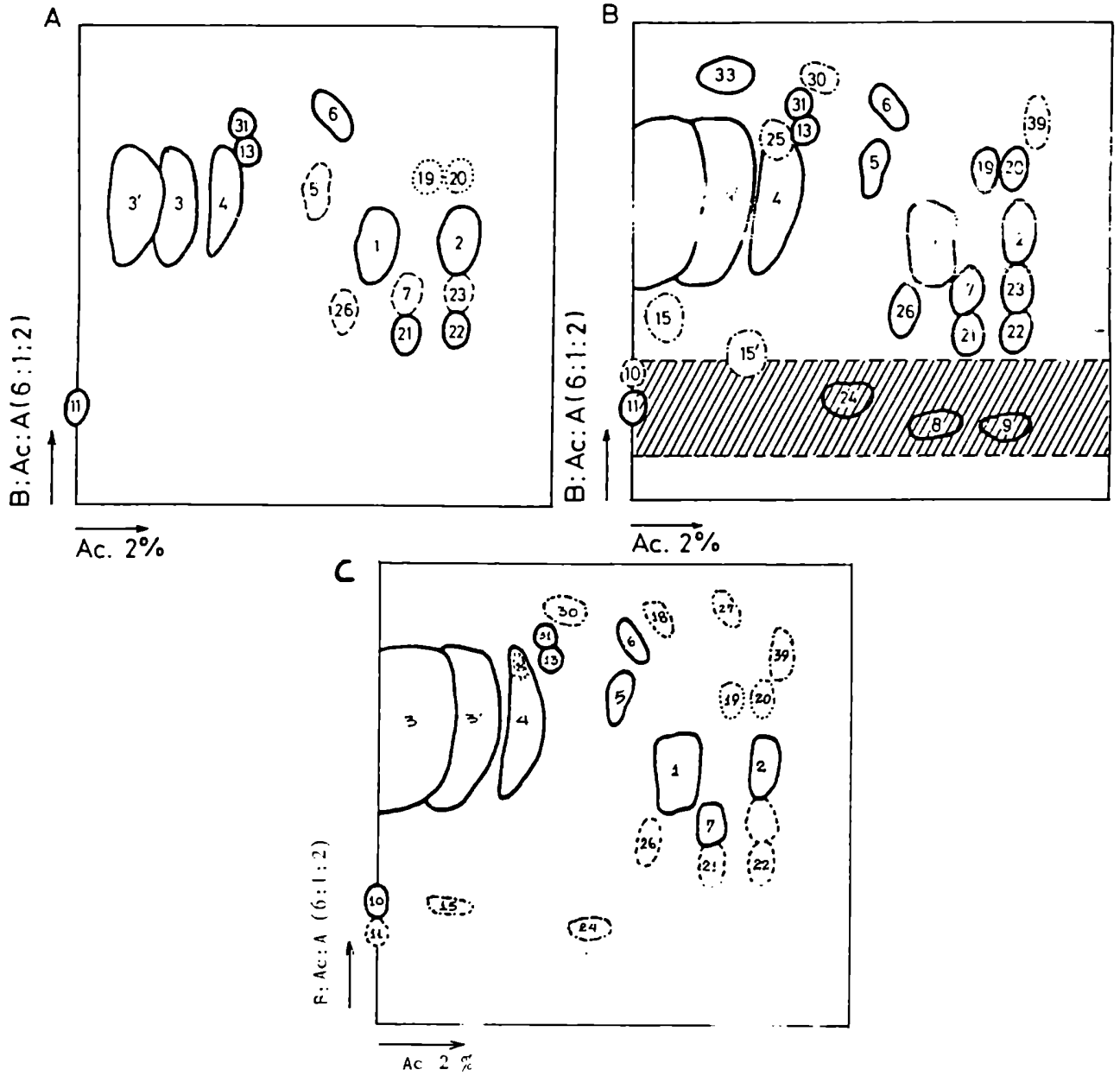
La siguiente etapa del trabajo obedeció a dos objetivos principales:

- a) conocer si existían diferencias cualitativas de los fenoles entre edades y
- b) estudiar si el incremento postinfeccional se debía a una mayor síntesis de formas preexistentes y/o a la síntesis de novo de compuestos.

III.3.3.2.1.1. Análisis de extractos no hidrolizados

En la Figura 31 se presenta el perfil cromatográfico de los compuestos fluorescentes hallados en los extractos metanólicos de las plantas testigo. No se encontraron diferencias entre los distintos estadios con respecto a los compuestos más abundantes: 1, 2, 3, 3', 4, 13, 31 y 6. Las características de las sustancias localizadas se detallan en la Tabla XXXII. El compuesto 25 se detectó únicamente en la edad I y los compuestos 8, 9, 40, 44 solo en el estadio II aunque no siempre estuvieron presentes. Las manchas 5, 7, 11, 21, 22, 23 y 26 parecían disminuir al aumentar la edad de la planta (Tabla XXXIII). Finalmente las manchas 19 y 20 aumentaron en tamaño e intensidad con la edad del hospedante (Tabla XXXIII).

Los extractos metanólicos provenientes de las zonas L de individuos inoculados contenían básicamente los mismos compuestos fenólicos independientemente de la edad del individuo y grado de tolerancia, a excepción del estadio IV en el que estaban ausentes los compuestos 15, 15', 18, 22, 27, 30, 39, 40 y 44 (Figura 31 y



Plantas cultivadas en cámara. Perfil cromatográfico de compuestos fluorescentes presentes en extractos metanólicos de tallos sanos (A), y de lesiones (B) y zonas sanas adyacentes (C) de tallos inoculados.: ausente en I; -.-.-: en I y/o II (no siempre presentes); ---: ausente en I y III; xxx: ausente en II y IV.

Tabla XXXII: Propiedades de fluorescencia y reacciones coloreadas de los fenoles de los extractos metanólicos en cromatografía sobre papel.

Comp. N°	UV	UV+NH ₃	FeCl ₃	DPNA	DPNA+CO ₃ Na	HNO ₂	HNO ₂ +alcali	FC	FC+NH ₃	AlCl ₃
1,2	Az	VeAm	G	Ca	Ro	Am	Ro	--	Az	Az
3,3'4	Az	VeAm	G	Ca	Ro	Am	Ro	--	Az	Az
5	--	Ve	--	Ros	Ros	—	—	--	--	—
6	Vi	Vi	--	--	--	—	—	--	--	--
-	Cel	Cel	--	--	--	—	—	--	--	--
8,9	--	AmVe	—	--	--	—	—	--	--	—
11	A,	A,	—	--	--	—	—	--	--	--
13	Cel	Cel	—	--	--	—	—	--	--	--
15,15'	Vi	VeAz	—	Ca	Vi	—	—	--	--	--
18	--	Vi	—	--	--	—	—	--	--	—
19,20	--	Az	—	--	--	—	—	--	--	—
21,22,26	Az	Ve	—	Ca	Ca	—	—	--	--	--
23	Vi	Vi	—	--	--	—	—	--	--	—
24	--	Ro	—	--	--	—	—	--	--	—
25	Cel	Cel	—	—	—	—	—	--	--	—
27	Vi	Vi	—	Ros	Vi	—	—	--	--	—
30	Mo	Mo	—	Am	—	—	—	--	--	—
31	Cel	Cel	—	—	—	—	—	--	--	—
33	--	Ve	—	Ros	Ros	—	—	--	--	—
39	--	Cel	—	Ros	Ros	—	—	--	--	—
44	—	Vi	—	Ros	Ro	—	—	--	--	—
45	--	--	—	--	Vi	—	—	--	--	—
46	--	--	—	Ca	Az	—	—	--	--	—
47	--	--	—	--	Vi	—	—	--	--	—
Fr	--	Am	—	--	--	—	—	--	--	—

Fr: banda difusa comprendida entre los Rf 0 y 0,3 en la dirección B:A.

--: no reacciona; —: no se reveló

AmVe: amarillo verdoso; Mo: morado; Ro: rojo; Ros: rosado; Vi: violeta; VeAm: verde amarillento; VeAz: verde azulado; cel: celeste; Az: azul; Ca: castaño
DPNR: p-nitroanilina diazotizada; FC: reactivo de Folin Ciocalteu

Tabla XXXIII: Presencia y abundancia relativa de los compuestos fenólicos individuales en las zonas de lesiones (L) y sanas adyacentes (SA) de tallos inoculados de distintas edades y en tejidos similares de plantas testigo.

Comp. N°	Inoculadas				Testigo					
	L				SA					
	I	II _T	II _S	IV	I	II _T	IV	I	II	IV
1,2	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2
3,3',4	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2
5	2	1	1	2	2	2(-)	2	1	1(-)	0
6	2	2	1	2	2	2	2	1	1(-)	1
7	3	3	1	3	3	2	2	1	1	0
8	2	2(-)	1	2	2	2	0	0	1(-)	0
9	2	2(-)	1	2	2	2	0	0	1(-)	0
10	2	2	1	2	2	1(-)	2	0	0	0
11	2	2	1	1	2	1	0	1	1	0
13	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1
15,15'	3	2(-)	1(-)	0	0	1(-)	0	0	0	0
18	2	1(-)	1(-)	0	0	1(-)	0	0	1	0
19,20	3	3	1(-)	2	0	2(-)	1	0	1(-)	1
21	3	2(-)	1(-)	2	1	2(-)	0	1	1	0
22	3	1(-)	1(-)	0	1	1	0	1	1(-)	0
23	3	3	1(-)	3	1	2(-)	0	1	1(-)	0
24	2	2(-)	1(-)	2	0	2(-)	0	0	0	0
25	1(-)		2(-)	2	2	0	0	2	0	0
26	3	2(-)	1(-)	2	2	2(-)	0	2	1(-)	0
27	2	1(-)	1(-)	0	0	1(-)	0	0	0	0
30	2	2(-)	1(-)	0	0	2(-)	0	0	0	0
31	0	2(-)	1(-)	2	1	1(-)	1	1	1	1
33	2	2(-)	2	2	0	0	0	0	0	0
39	3	1(-)	1	0	0	2(-)	0	0	0	0
40	1(-)		0	0	0	0	0	0	1(-)	0
44	1(-)		0	0	0	0	0	0	1(-)	0
45	2	?	?	?	?	?	?	?	?	?
46	2				?	?			?	?
47	2	?
Fr	3	3	2	3	0	0	0	0	0	0

I: estadio vegetativo; II_T: individuos tolerantes en estadio de botón floral cerrado; II_S: individuos susceptibles en estadio de botón floral cerrado; IV: estadio de botón floral abierto; escala subjetiva basada en intensidad de fluorescencia y tamaño de las manchas: 3: abundante; 2: intermedio; 1: escaso; 0: ausente; (-): no siempre presente; ?: cromatograma no revelado con agente específico para ese compuesto.

Tabla XXXIV: Valores de Rf de los principales componentes del extracto metanólico en cromatografía sobre papel.

Compuesto N°	Sistemas de solventes	
	B:Ac:A	Ac 2%
1	0,53	0,62
2	0,56	0,80
3, 3' 4	0,65	0,1; 0,2; 0,3
5	0,7	0,51
6	0,81	0,53
7	0,46	0,68
8	0,17	0,63
9	0,16	0,75
10	0,26	0
11	0,19	0
13	0,74	0,33
15	0,40	0,07
15'	0,34	0,24
18	0,85	0,60
19	0,70	0,74
20	0,68	0,80
21	0,38	0,69
22	0,40	0,79
23	0,49	0,81
26	0,40	0,55
24	0,23	0,45
25	0,74	0,25
30	0,88	0,39
31	0,80	0,35
33	0,90	0,19
39	0,74	0,84
40	0,77	0,65
44	0,81	0,60
45	0,05	0,45
46	0,20	0,95
47	0,35	0,95
Fr	0-0,3	0-1

Cada valor es promedio de aproximadamente 30 papeles.

Tabla XXXIII). La principal diferencia residió en la intensidad de la fluorescencia y el tamaño de las manchas, las que resultaron menores en los cromatogramas de los tallos II₅. Al comparar los perfiles cromatográficos de L respecto a los testigos se distinguieron algunos nuevos compuestos cuyas características se presentan en la Tabla XXXII y XXXIV. Estos fueron los números 10, 15, 15', 24, 27, 30, 33, 39 y una franja comprendida entre los Rf 0 y 0,3 en la dirección B-AcA-A (Figura 31) en la que se presentaron una serie de compuestos que no exhibían fluorescencia al UV pero surgían como manchas difusas color amarillo fuerte al ser expuestas a los vapores de amonio.

En los extractos de las zonas SA se detectaron los mismos compuestos que en los correspondientes tallos testigo más los denominados 10 (en I, II y IV); 9 (en I y II); 8 (en I); 15, 24, 27, 30, 9 (en II) y 5 7 (en IV). Las manchas eran más grandes y la fluorescencia más intensa que en los cromatogramas de los tallos testigo (Figura 32 y Tabla XXXIII).

Las reacciones de color obtenidas al rociar los cromatogramas con los distintos reveladores permitió discernir que al menos los compuestos N°1, 2, 3, 3', 4, 5, 9, 15, 15', 21, 22, 26, 33, 39, 45, 46, 47 y 44, son de naturaleza fenólica (Tabla XXXII). El reactivo de p-nitroanilina diazotizada solo se utilizó en la revelación de papeles sembrados con extractos L de edad I con lo cual no es posible afirmar que los compuestos 45, 46 y 47, solo puestos de manifiesto por este medio, se encontraban o no presentes en los demás casos.

III.3.3.2.1.2. Análisis de extractos hidrolizados

La hidrólisis ácida de los extractos de tallos inoculados no rindió cantidades apreciables de algiconas, lo que daría idea que no existe una cantidad importante de fenoles conjugados en forma de glicósidos (Ribereau-Gayon, 1972).

La hidrólisis básica, por el contrario proporcionó una apreciable cantidad de compuestos luego identificados como ácidos fenólicos y fenilpropanoides. Esto indicó que, en los extractos, dichos compuestos se hallan en forma de ésteres (Ribereau-Gayon, op. cit.). Los valores de Rf de las manchas

detectadas sobre cromatografías en capa delgada de celulosa el color de su fluorescencia, las reacciones de color que exhibieron luego del revelado de las placas con el reactivo del ácido sulfanílico y la cocromatografía con marcadores auténticos, permitió la identificación de el ácido p-hidroxibenzoico, sirínigico, cafeico, ferúlico y p-cumárico (Figura 32 y Tabla XXXV).

Cuatro compuestos fluorescentes no identificados se localizaron también sobre las capas de celulosa, pero no reaccionaron con el ácido sulfanílico (Figura 32 y Tabla XXXV).

III.3.3.2.2. Plantas cultivadas a campo

A fin de conocer si los compuestos fenólicos presentes en los tallos de plantas cultivadas en cámara bioclimática se encontraban también en individuos cultivados a campo se efectuó un análisis cualitativo de los extractos acuosos obtenidos del material descrito en III.2.4.3.2. y en extractos metanólicos del material descrito en III.3.3.1.2.1.

III.3.3.2.2.1. Análisis de extractos no hidrolizados

Los perfiles cromatográficos de los extractos acuosos provenientes de los tallos S₁ (cfr III.2.4.3.2) no difirieron de los de los tallos S₇ (Figura 33), a excepción de la ausencia de los compuestos 3 y 7 en este último grupo. La principal diferencia residió en la concentración total de los fenoles (S₁: 5,22 mg/gr de Peso Fresco; S₇: 2,13 mg/gr y testigo: 0,4 mg/gr de Peso Fresco). Los compuestos localizados corresponden a los N°1, 2, 3, 4, 6 y 7 hallados en las plantas cultivadas en cámara bioclimática.

Los extractos metanólicos de las L de tallos tolerantes (cfr. III.3.3.1.2.1.) presentaron mayor riqueza que los extractos acuosos de S₁ recientemente descritos. Sin embargo al igual que en estos y en todos los extractos inhibidores (Figura 34) los compuestos predominantes fueron los 3, 3', 4. No hubo diferencias cualitativas entre plantas cultivadas a campo y en cámara (II_T)

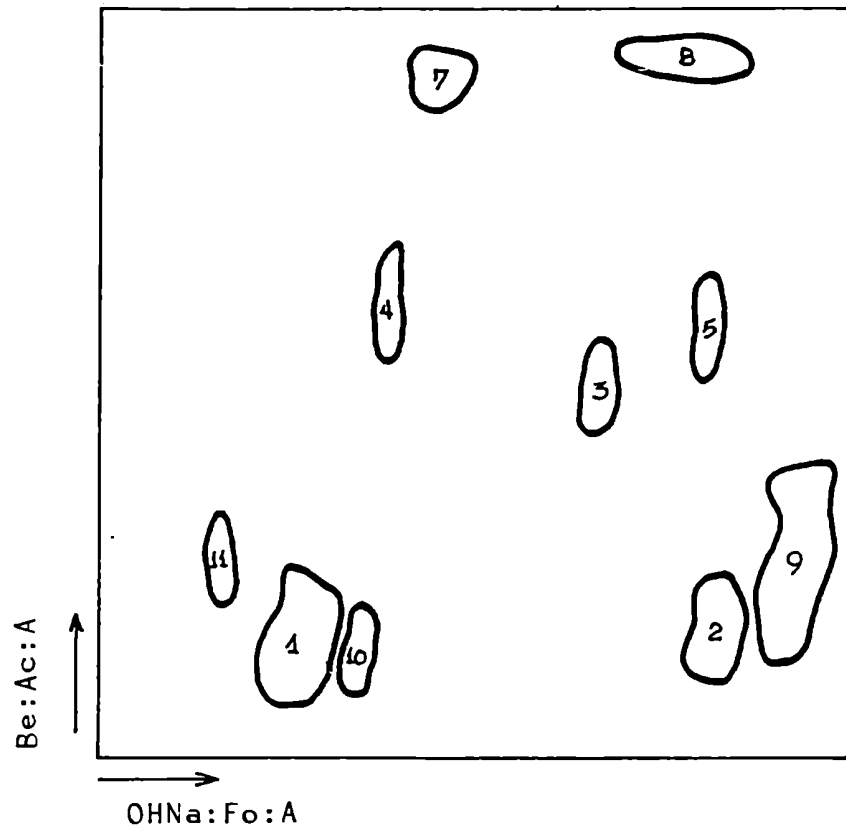


Figura 32: Plantas cultivadas en cámara. Perfil cromatográfico de compuestos fluorescentes en extractos metanólicos de tallos inoculados, sujetos a hidrólisis básica.

Tabla XXXV: Propiedades de fluorescencia, reacciones coloreadas e identidad de las principales agliconas presentes en hidrolizados básicos de extractos metanólicos de plantas inoculadas, cultivadas en cámara.

Compuesto N°	Identidad	Ac. Sulfanílico	UV	UV+NH ₃
1	Ac. trans. cafeico	G	cel	cel br.
2	Ac. cis-cafeico	G	cel	cel br.
11	Ac. siríngico?	Ro	Mo	Mo
3	Ac. p-hidroxibenzoico	Am	Mo	Vi br.
4	Ac. trans p-cumárico	Ros	Mo	Mo
5	Ac. cis-p-cumárico	Ros	Mo	Mo
7	Ac. ferúlico	Pa Ro	Ay	Ay br
8	no identificado		Mo	Mo
9	no identificado		Vi	Vi
10	no identificado	AmVe	Cel	Cel

Am: amarillo; AmVe: amarillo verdoso; Az: azul; Cel: celeste; Cel br: celestre brillante; G: gris; PaRo: pardo rojizo; Mo: morado; Ro: rojo; Ros: rosado; Vi: violeta; Vibr: violeta brillante; -: no reacciona.

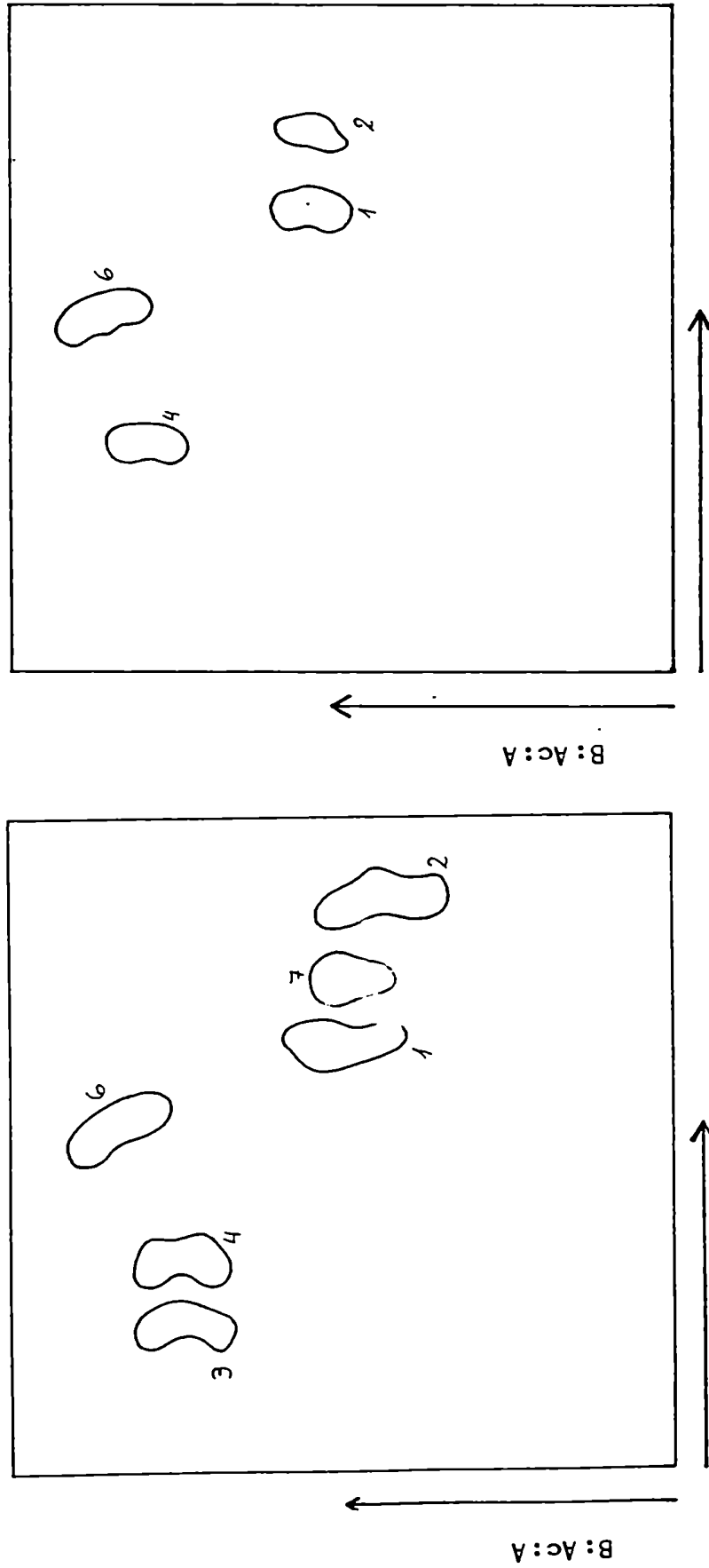


Figura 33: Plantas cultivadas a campo. Perfiles cromatográficos de los compuestos fluorescentes en extratos acuosos, obtenidos de lesiones de tallos inoculados que presentaban A: podredumbre incipiente, y B: podredumbre avanzada.

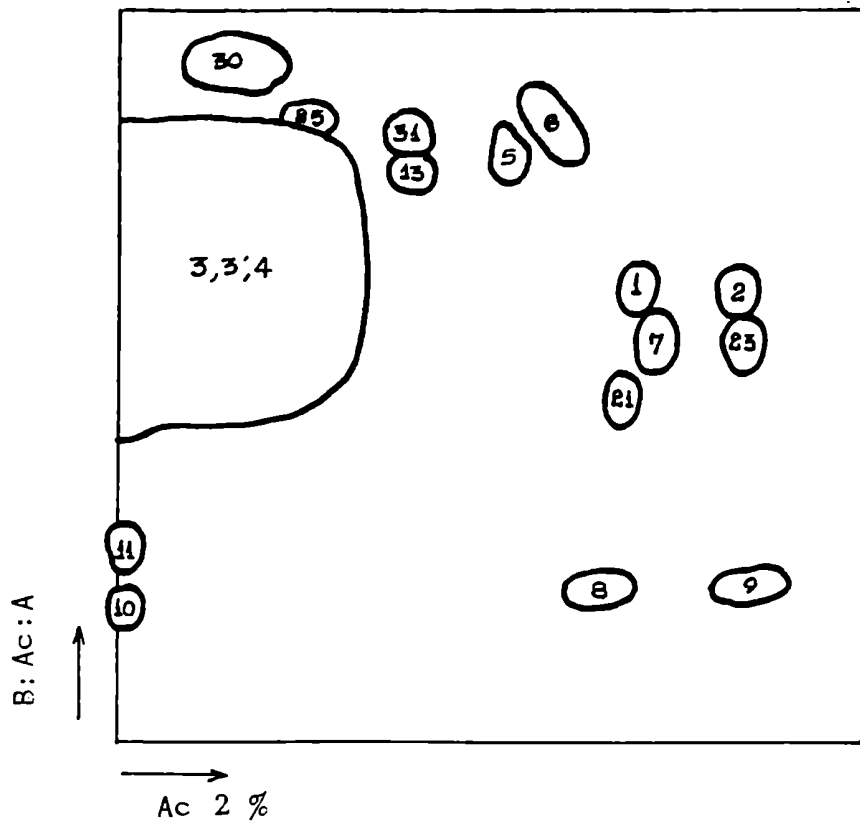


Figura 34: Plantas cultivadas a campo. Perfil cromatográfico de los compuestos fluorescentes en extractos metanólicos obtenidos de las lesiones de tallos tolerantes.

respecto a los compuestos presentes, pero en las primeras estuvieron ausentes los compuestos 15, 15', 19, 21, 21, 22, 24, 27, 30, 39 y la franja (comparar Figuras 31 y 34).

III.3.2.2.2. Análisis de extractos hidrolizados

Se realizó la hidrólisis básica de los extractos acuosos de plantas S₁. A través de la metodología descrita en 11.9.2.2.3.b fue posible identificar la presencia de los ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico y vanílico (Tabla XXXVI y Figura 35).

III.3.3.2.3. Análisis cromatográficos de extractos no hidrolizados de Helianthus tuberosus.

Con el propósito de conocer el grado de especificidad de los eventuales componentes de la defensa se estudió los perfiles cromatográficos de otra especie del mismo género que se describe como tolerante a esta enfermedad.

Los tubérculos de este vegetal se plantaron en invernáculo. Las plantas en estadio vegetativo (3 meses de edad) fueron inoculadas en la base del tallo según el método estandarizado (III.1.2). Los individuos resultaron tolerantes a la enfermedad. Presentaron lesiones castañas uniformes limitadas, superficiales con una longitud media de 2 cm al 12º día. No se observó marchitez foliar.

Se obtuvieron extractos metanólicos de las L y SA. Dichos extractos poseyeron efecto inhibitor del CM en el caso de las L pero no lo afectaron cuando provenían de las SA (Tabla XXXVII).

Los perfiles cromatográficos de los extractos de L no hidrolizados mostraron la presencia de los compuestos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 21, 22, 23 y 10. Los compuestos predominantes fueron los 1, 2, 3 y 4.

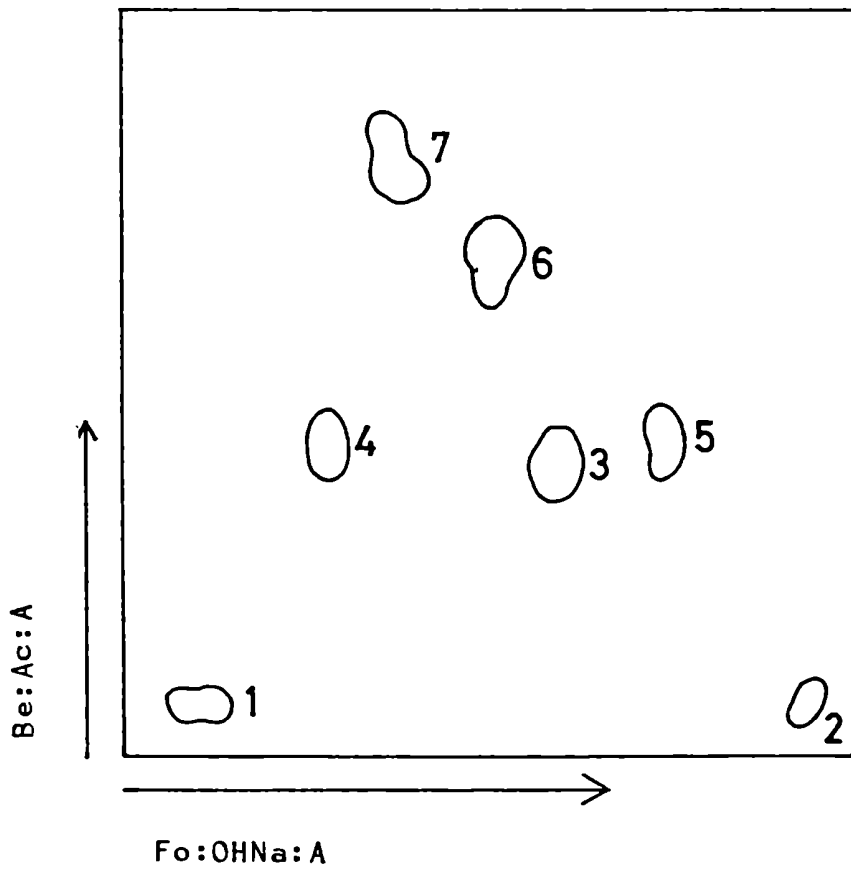


Figura 35: Plantas cultivadas a campo. Perfil cromatográfico de compuestos fluorescentes en extractos metanólicos de tallos inoculados, sujetos a hidrólisis básica.

Tabla XXXVI: Propiedades de fluorescencia, reacciones coloreadas e identidad de las principales agliconas presentes en hidrolizados básicos de extractos acuosos de plantas inoculadas, cultivadas a campo.

Compuesto N°	Identidad	Ac. sulfanílico	UV	UV+NH ₃
1	Ac. trans-cafeico	G	Cel	Cel br.
2	Ac. cis-cafeico	G	Cel	Cel br.
3	Ac.p-hidroxibenzoico	Am	Mo	Mo
4	Ac. trans-p cumárico	Ros	Mo	Vi
5	Ac. cis-p-cumárico	Ros	Mo	Vi
6	Ac. vainílico	Na	Mo	Vi
7	Ac. ferúlico	PaRo	Az	Az br.

Am: amarillo; Az: azul; Az br: azul brillante; Cel: celeste; Cel br: celeste brillante; G: gris; PaRo: pardo rojizo; Mo: morado; Ros: rosado; Na: naranja; Vi: violeta.

Tabla XXXVII: Efecto de extractos metanólicos obtenidos de zonas de lesiones (L) y tejidos sanos adyacentes (SA) de tallos de H. tuberosus sobre el CM, al 7º día de la inoculación (% respecto al medio basal) (10 mg PS de extracto/ml de medio).

	L	SA
Efecto (%)	- 32*	+ 1

-: efecto inhibidor; +: efecto promotor.

*: efecto inhibidor significativo (P: 0,01).

III.3.3 2.4. Conclusiones

- No existen variaciones cualitativas de los compuestos fenólicos más abundantes en los tallos sanos a lo largo del ciclo ontogénico de la planta. Tampoco se encontraron diferencias de este tipo en las distintas zonas del tallo estudiadas.
 - En los tallos inoculados se presentaron los mismos compuestos que en los testigos además de un cierto número de nuevos compuestos. Las diferencias entre estadios parecerían ser fundamentalmente cuantitativas. Tanto en plantas de H. annuus cultivadas a campo y en cámara bioclimática, como en tallos de H. tuberosus; se observaron los mismos compuestos fenólicos predominantes.
 - El denominador común a todos los extractos inhibidores fue la presencia y abundancia de los compuestos 3, 3' y 4.
 - Las agliconas liberadas por la hidrólisis básica de los extractos de zonas L de plantas cultivadas a campo y en cámara fueron básicamente las mismas. Los principales fenoles identificados se hallarían conjugados en forma de ésteres. Se trata de los ác. cafeico, ferúlico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico, vanílico y siríngico. Cabe destacar que estos ácidos en su forma libre son capaces de inhibir la germinación esporal o el crecimiento de numerosos patógenos (Kuć et al., 1956; Schaal y Johnson, 1965; Flood y Kirkham, 1960; Byrde et al., 1960; Friend, 1977; Alfenas et al., 1982, etc).
- Finalmente es interesante señalar que los compuestos identificados han sido citados en tallos de girasol sano e inoculado con Plasmopara halstedii (Cohen e Ibrahim, 1975) así como en semilla de girasol (Leung et al., 1981).

III.3.4. Compuestos aislados de plantas cultivadas en cámara bioclimática

III.3.4.1. Estudios comparativos de las concentraciones en plantas sanas e inoculadas tolerantes y susceptibles.

Fue interesante conocer si la acumulación postinfeccional hallada en las zonas L de los tallos inoculados se debía al incremento de algún compuesto específico, a la sola aparición de los nuevos fenoles descritos en el punto anterior, o a una alteración general de todos los fenoles. El aumento de la intensidad de la fluorescencia en los cromatogramas hacía sospechar que esta última hipótesis era la cierta.

Como aún no se contaba con la identidad de los compuestos fenólicos localizados, no era posible su cuantificación exacta a través de sus coeficientes de extinción molecular.

Se utilizaron dos métodos alternativos: el método de Folin-Ciocalteu (II.2.5.2.2.a) y un método relativo, pero útil a fines comparativos, consistente en comparar los máximos de absorción de los espectros de un mismo compuesto proveniente de igual peso de tejidos extraído de los distintos tratamientos en estudio (II.2.5.2.2.b). Este estudio fue además útil para una primera caracterización de los compuestos aislados, ya que una propiedad de los fenoles es la de mostrar absorción a la luz UV. Por ello presentan espectros típicos al ser expuestos a distintas longitudes de onda, los que son útiles para su identificación.

Se estudiaron los compuestos aislados de tallos testigo de edad I e inoculados de edad I y II_S. En algunos casos se agruparon compuestos que por sus características cromatográficas similares parecían isómeros o muy afines. Si bien se encontró una mayor concentración de todos los compuestos en las plantas tolerantes, el grupo formado por los compuestos número 1, 2, 3, 3', 4, 5, 21, 26 y 25 fue el que más se incrementó (Tabla XXXVIII y Figura 36). El espectro de esta mezcla presentó un máximo de absorción a 328 nm. Este máximo fue 30 veces mayor que el correspondiente al testigo cuando se trataba de plantas de edad I inoculadas, la que a su vez se reveló 3 veces mayores que la observada en plantas II_S.

La mezcla de los compuestos 15 y 15' que no fue detectada en las plantas sanas (Tabla XXXVIII) le siguió en importancia. La absorción máxima a 322 nm

Tabla XXXVIII: Concentraciones de los principales compuestos fenólicos aislados de plantas testigo de edad I y de lesiones de tallos inoculados de edad I (vegetativo) y II₅ (individuos susceptibles en estadio de botón floral cerrado) (método de Folin-Ciocalteu, mg de fenol/gr de PF).

Compuestos	Testigo	I inoculado	II ₅
1,2,3,3',4,5,21,26 y 25	0,1	2,9	1,25
15 y 15'	ausente	1,16	0,09
Franja	0,04	0,17	0,125
30 y 33	ausente	0,06	0,03
10,20 y 39	ausente	0,04	no cuantificable

Cada valor proviene de una muestra única constituida por el tejido obtenido de 8 individuos por tratamiento.

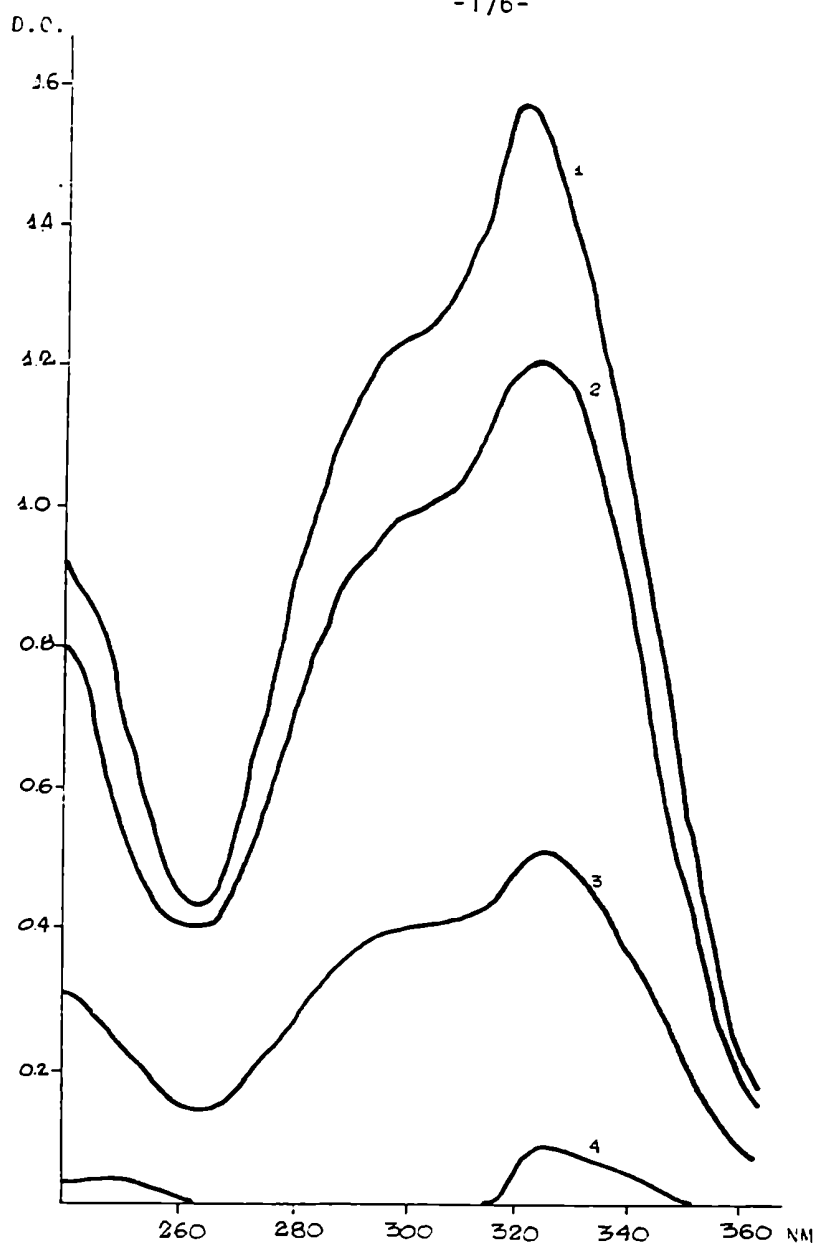


Figura 36: Espectros de absorción a la luz UV de la mezcla (1, 2, 3, 3', 4, 5, 21, 26, 25), obtenida de cromatogramas de extractos metanólicos extraídos de las lesiones de tallos de estadio I (tolerante) (1) y estadio II₅ (individuos susceptibles) (3), y de tejidos similares de estadio I testigo (plantas sanas) (4); observar estrecha similitud con el espectro de absorción del ácido clorogénico comercial (2). Las mezclas provienen de iguales cantidades de tejido vegetal inicial.

fue 5 veces mayor en la edad tolerante que en la susceptible (Figura 37). En cuanto a la franja (banda difusa comprendida entre los Rf 0-0,3 en la dirección del B:Ac:A), la mezcla del testigo y II_S presentó aproximadamente la misma absorción a 240 nm en tanto que la del estadio I inoc. fue aproximadamente el doble de las anteriores (Figura 38). Es interesante señalar que no se distinguía fluorescencia en esta zona en los cromatogramas provenientes de las plantas sanas. Sin embargo se obtuvo reacción con los dos métodos empleados. Con respecto a los compuestos 30 y 33 se encontró un desfase entre los métodos, aunque siempre esta mezcla fue mayor en el estadio I inoc. La absorbancia a la longitud máxima (245 nm) fue 9 veces mayor en este estadio que en el susceptible. Sin embargo, el método colorimétrico arrojó diferencias de aproximadamente el doble de concentración de I inoc. respecto a II_S (cfr. Tabla XXXVIII y Figura 39). La mezcla 19, 20 y 39, no pudo ser detectada en el estadio II_S con el método colorimétrico y estaban ausente en el testigo. Su concentración en I inoc. fue 0,04 mg/g de PF. La mezcla 13 y 31 no se cuantificó con el reactivo de Folin-Ciocalteu, sin embargo los espectros demostraron que estaba más concentrada en el estadio I inoc., mientras que se encontraba en cantidades similares en el resto de las plantas (Figura 40).

Los resultados obtenidos permiten concluir que la infección traería como consecuencia una alteración general del metabolismo fenólico. Esta involucraría tanto el incremento de formas preexistentes como la aparición de nuevos compuestos. Sin embargo, el grupo 1, 2, 3, 3', 4, 5, 21, 26 y 25 se acumuló en mayor proporción esa acumulación fue mayor en las plantas tolerantes respecto a las susceptibles. Sin embargo en estas últimas se produciría una reacción menor. Este hecho corroboraría el principio general acerca de que las diferencias entre susceptibilidad y tolerancia no suele residir en diferencias cualitativas sino cuantitativas de los componentes de la defensa.

Finalmente es interesante señalar que mientras en el testigo el conjunto de los compuestos aquí analizados constituyó el 30% de los fenoles totales, en el estadio I inoc. representó el 44% y en el II_S el 42%.

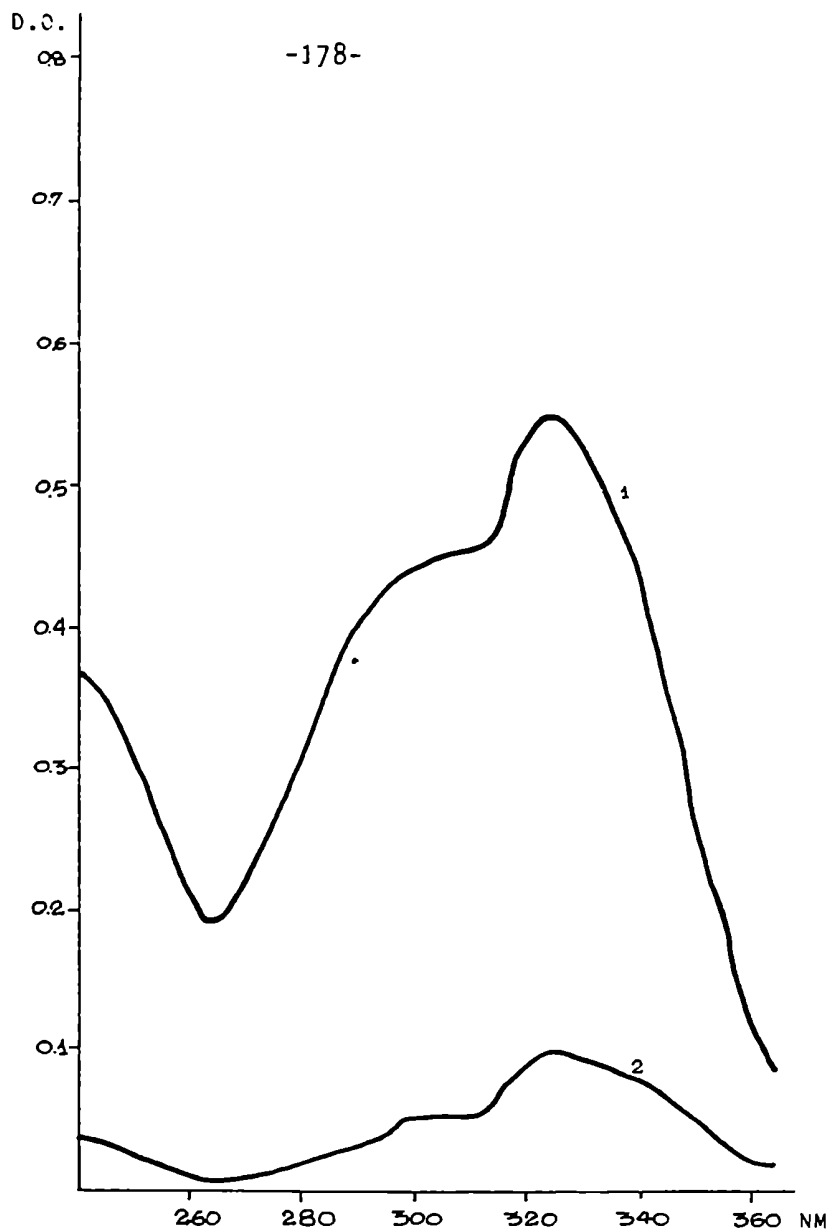


Figura 37: Espectros de absorción a la luz UV de la mezcla (15, 15'), obtenida de cromatogramas de extractos metanólicos extraídos de las lesiones de tallos de estadio I (tolerante) (1) y II₅ (individuos susceptibles) (2). Las mezclas provienen de iguales cantidades de tejido vegetal inicial.

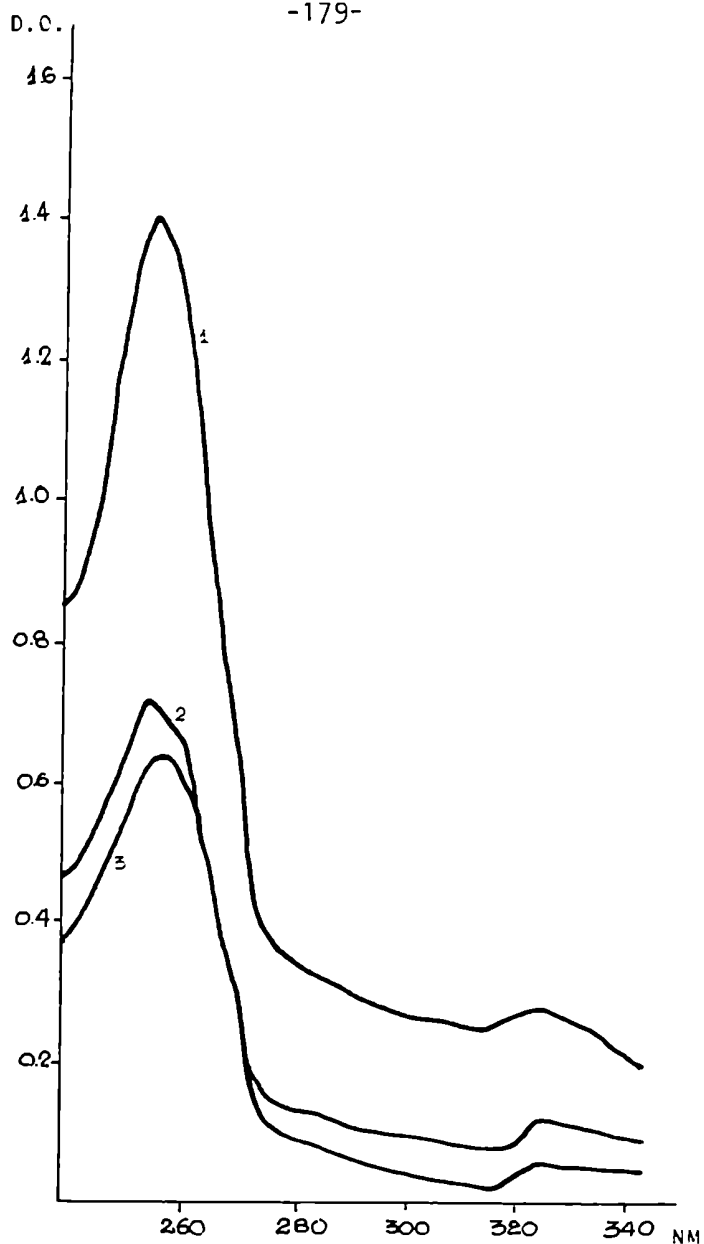


Figura 38: Espectros de absorción a la luz UV de la "franja" banda difusa comprendida entre Rf 0-0,3 en dirección B-Ac-A) obtenida de cromatogramas de extractos metanólicos extraídos de las lesiones de tallos de estadio I (tolerante) (1) y II ζ (susceptible) (2), y de tejidos similares de estadio I testigo (plantas sanas) (3). Las mezclas provienen de iguales cantidades de tejido vegetal inicial.

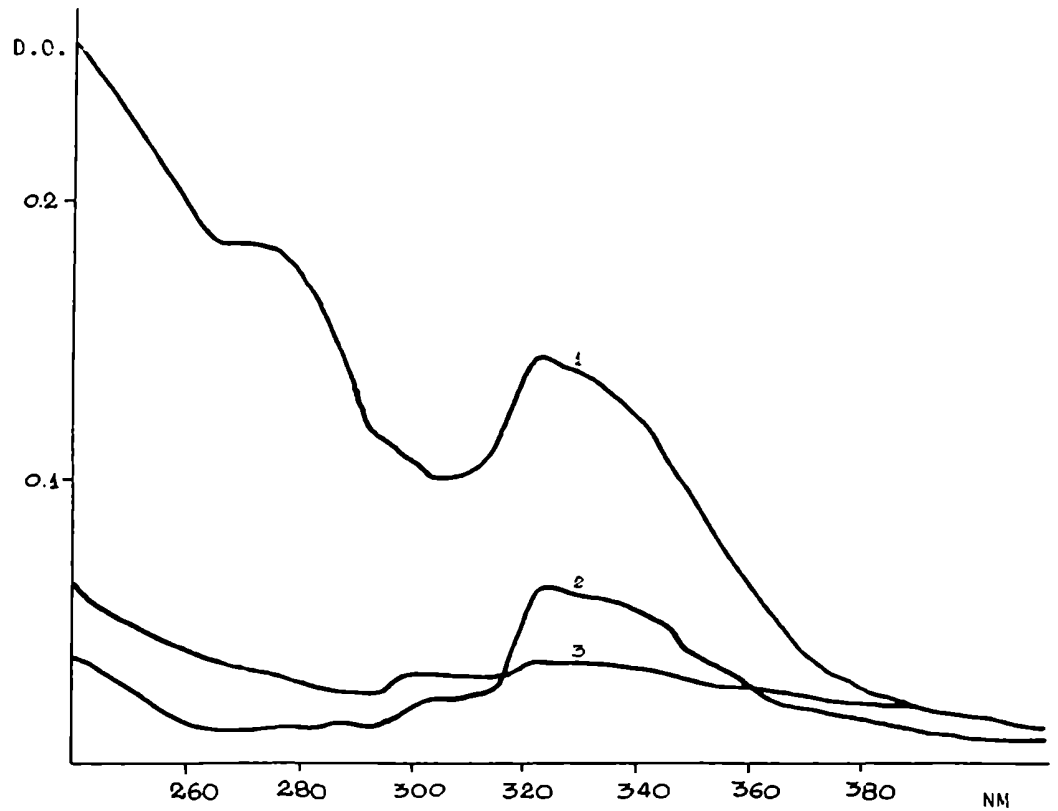


Figura 39: Espectros de absorción a la luz UV de la mezcla (30, 33), obtenida de cromatogramas de extractos metanólicos extraídos de las lesiones de tallos de estadio I (tolerante) (1) y II_S (individuos susceptibles) (2), y de tejidos similares de estadio I testigo (plantas sanas) (3). Las mezclas provienen de iguales cantidades de tejido vegetal inicial.

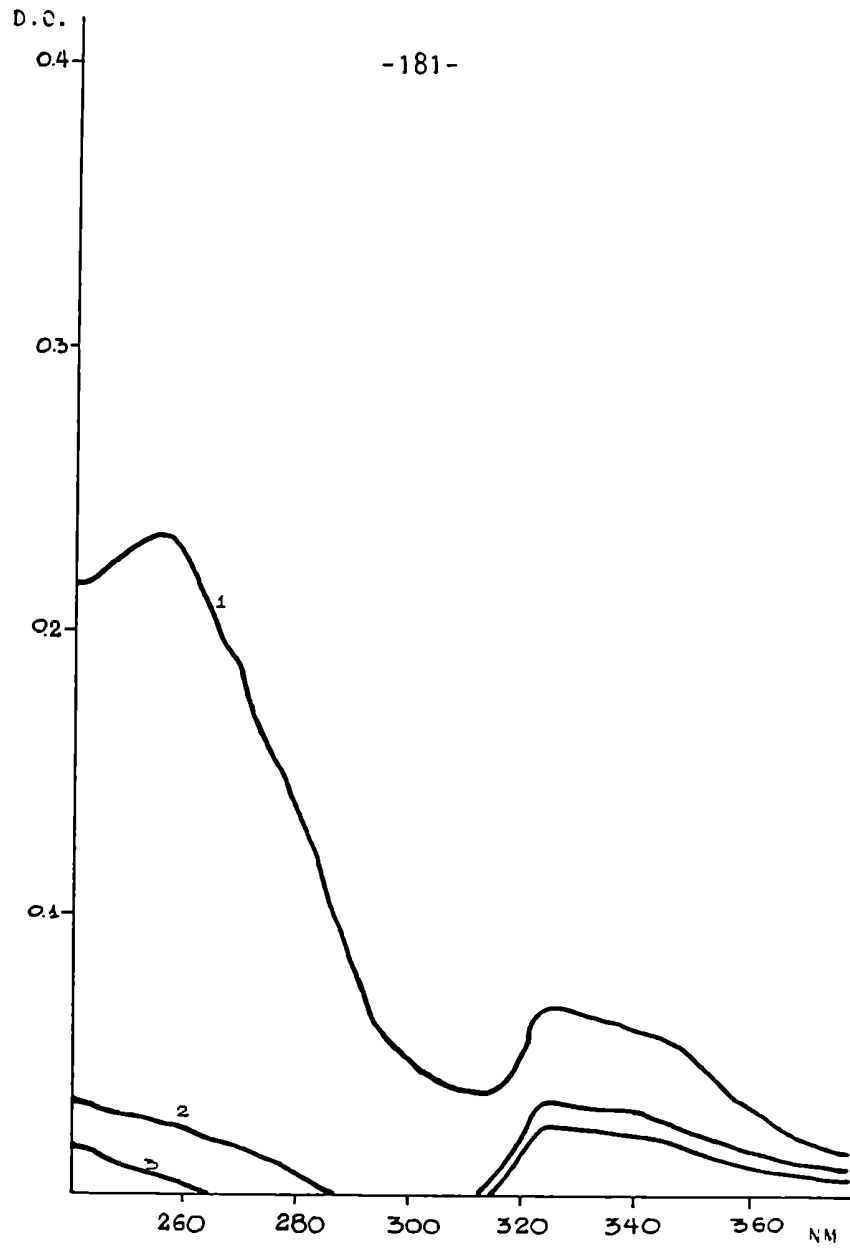


Figura 40: Espectros de absorción a la luz UV de la mezcla (13, 31), obtenida de cromatogramas de extractos metanólicos extraídos de las lesiones de tallos de estadio I (tolerante) (1) y IIS (individuos susceptibles) (2), y de tejidos similares de estadio I testigo (plantas sanas) (3). Las mezclas provienen de iguales cantidades de tejido vegetal inicial.

III.3.4.2. Efecto de los principales compuestos sobre el CM.

En forma preliminar se llevó a cabo un ensayo con los principales fenoles aislados de los tallos inoculados del estadio I. Estos se incorporaron a un medio de cultivo mineral definido (II.2.1) que contenía pectina como única fuente carbonada. Tal decisión obedeció al hecho de que, en algunos casos, los fenoles actúan a través de la inhibición de las enzimas de los patógenos. Las principales enzimas de S. sclerotiorum son inducibles por sustrato e inhibidas por glucosa (I.3.3.3.4).

En la Figura 41 se ha representado el CM en los diversos medios (compuestos fenólicos aislados de 400 mg de PF inicial/ml de medio), en función del tiempo de inoculación. En todos los casos se obtuvo un ajuste de tipo lineal. Del análisis de las pendientes de las distintas rectas obtenidas fue posible determinar que pertenecían a tres grandes grupos (Tabla XXXIX). Las obtenidas con los medios a los que se habían agregado los compuestos 15, 15'; 19, 20, 39; 7 y 23 no difirieron de la obtenida con el medio básico, sin agregados. Un segundo grupo, en el cual la velocidad de crecimiento se vió reducida en un 42,5%, estuvo constituido por los medios con agregados de las mezclas 30, 33, 13, 6 y 18, 27, 40, 44. El tercer grupo incluyó las mezclas más inhibitoras que resultaron la 3, 3', 4, 1, 2, 21, 22, 26, 5 y la franja. Ambas mezclas produjeron una disminución en la velocidad del CM de un 60 y 59% respectivamente (Tabla XXXIX). Al 7º día después de la inoculación, la mezcla 3, 3', 4, 1, 2, 21, 22, 26, 5 produjo un 70% de inhibición y la franja un 74%. La pendiente de la curva del compuesto 47 no difirió significativamente de las determinadas para los grupos dos y tres, exhibiendo un 52% de reducción respecto al testigo.

El agregado del segundo y tercer grupo de compuestos, así como del compuesto 47 a los medios de cultivo inhibió la formación de esclerocios en los mismos (Tabla XXXX). El resto de los compuestos no afectó la formación de estas estructuras respecto al testigo, a excepción del grupo 19, 20, 39 que tuvo características intermedias (Tabla XXXX). Lo mismo ocurrió con respecto al peso seco promedio de los esclerocios (Tabla XXXX).

En un segundo experimento se comparó el efecto producido por los compuestos aislados de idénticas cantidades de peso fresco inicial de individuos

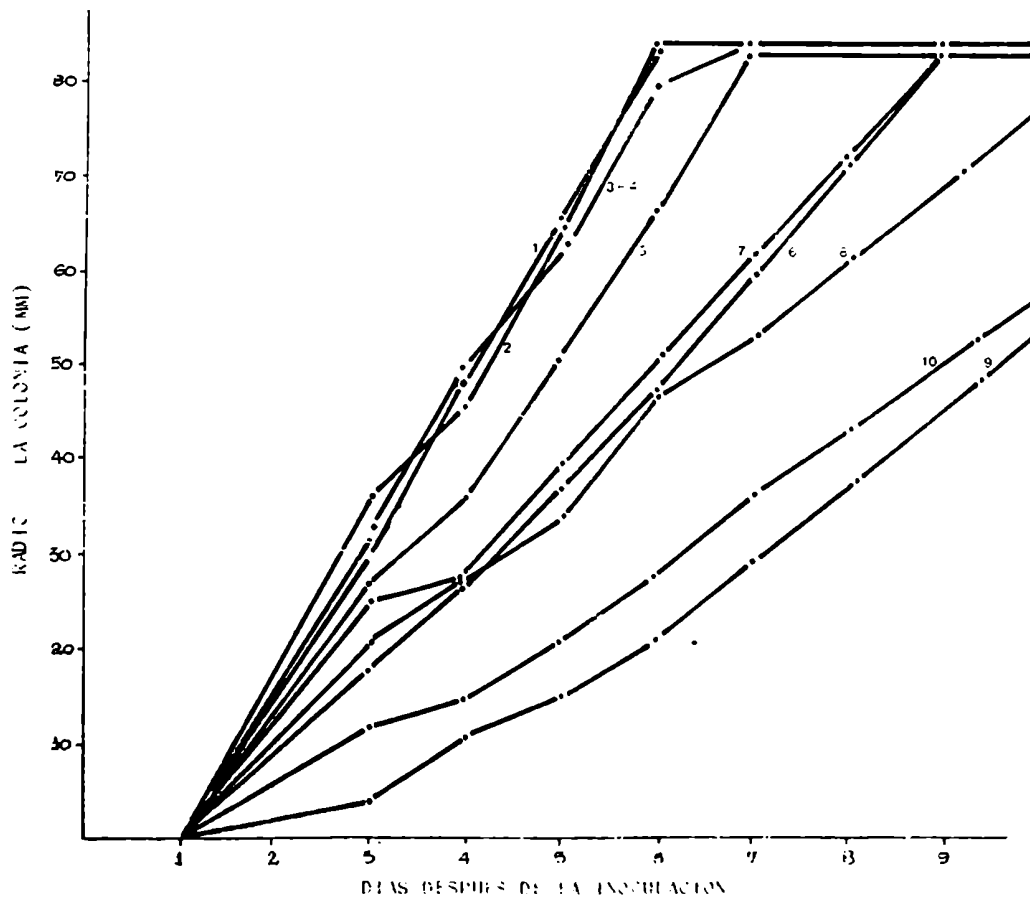


Figura 41: Crecimiento celular en función de tiempo de inoculación sobre un medio basal (1), y en dicho medio más el agregado de mezclas de compuestos fenólicos aislados de extractos metanólicos, de lesiones de tallos tolerantes (estadio I) 2: (7); 3: (15, 15); 4: (17, 20, 39); 5: (23); 6: (18, 27, 40, 44); 7: (30, 35, 13, 6); 8: (47); 9: (franja) y 10: (1, 2, 3, 3', 4, 5, 21, 22, 26). Cada valor es promedio de 4-3 repeticiones. Las mezclas agregadas corresponden a 400 mg de PF de tejido inicial/ml de medio.

Tabla XXXIX: Coeficientes de regresión calculados mediante el método de los cuadrados mínimos para las curvas que representan el CM en función del tiempo, en medios con el agregado de diversos compuestos fenólicos aislados de tallos tolerantes inoculados (I) (provenientes de 400 mg de PF inicial/ml).

Medio de cultivo	Pendiente	% de reducción respecto al testigo
Testigo (basal sin agregados)	1,7 ^a	0
basal + 15, 15'	1,55 ^a	9,0
basal + 19, 20, 39	1,47 ^a	13,5
basal + 7	1,59 ^a	6,5
basal + 23	1,43 ^a	15,9
basal + 18, 27, 40, 44	1,04 ^b	38,8
basal + 30, 33, 13, 6	0,95 ^b	44,1
basal + 47	0,82 ^{bc}	51,8
basal + 3, 3', 4, 1, 2, 21, 22, 26, 5	0,67 ^c	60,6
basal + franja	0,7 ^c	58,0

Cada valor de pendiente se obtuvo a partir de 4-8 repeticiones.

Valores seguidos por letras distintas indican diferencias significativas al 1%.

Tabla XXXX: Número promedio por caja y peso seco de esclerocios formados al 11° día sobre medios de cultivo con el agregado de diversos compuestos aislados de tallos tolerantes inoculados (I) (provenientes de 400 mg de PF inicial/ml).

Compuestos agregados al medio basal	Ninguno (testigo)	15,15'	7	23	19,20,39	18,27,40,44	47	80,33 13,6	3,3',4	Fr
N° promedio de esclerocios	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	0,5 ^b	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c
Peso seco/ esclerocio (mg)	8,0 ^a	4,5 ^a	10,2 ^a	4,7 ^a	1,75 ^b	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c

Las comparaciones son solo válidas dentro de cada fila.

Cada valor es promedio de 4-8 repeticiones.

Letras distintas indican diferencias significativas (P: 0,01).

tolerantes (I) y susceptibles (II_S). En este caso, la mezcla que había resultado más inhibidora en el ensayo anterior fue separada en grupos más pequeños: 1, 2; 3, 3', 4 ; 5, 1, 22, 26 para conocer si todos o algunos de ellos eran responsables de producir el mencionado efecto. La mezcla 30, 33, 13, 6 se separó en los grupos 30, 33 ; 13, 31 ; y 6 .

Al igual que en el primer ensayo los compuestos 7 ; 19,20,39 ; 15, 15' y 23 no afectaron el CM independientemente de su origen. Tampoco lo hizo el compuesto 25 ; del grupo 1, 2,... pudo descartarse los subgrupos 1, 2 ; 21, 22, 26 y 5 los cuales no inhibieron el CM independientemente de su procedencia. Todo el efecto del grupo mayor recayó en el subgrupo 3, 3', 4 en el caso de provenir del extracto tolerante. Por el contrario cuando el subgrupo se aisló del tallo II_S no alteró substancialmente el CM (Tabla XXXX).

Con respecto a la "franja" (banda difusa comprendida entre los Rf 0-0,3 en la dirección B:Ac:A), el efecto promedio fue significativamente inhibidor. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla XXXXI). Esto restaría importancia a su relación con las diferencias en susceptibilidad; más aún los resultados obtenidos en los distintos experimentos presentaron resultados muy variables probablemente debido a la gran heterogeneidad de los compuestos presentes en la mezcla.

El compuesto 6 no produjo ningún tipo de efecto sobre el CM. El subgrupo 30, 33 proveniente del estadio tolerante inhibió significativamente el CM respecto al testigo y respecto al mismo subgrupo extraído de II_S . Sin embargo el eluido de cromatogramas control (desarrollados pero sin sembrar) correspondiente a las zonas donde se los localizaba tuvo efecto inhibidor mayor que II_S . Algo semejante ocurrió con la mezcla 18, 47, 27 (Tabla XXXXI). Esto hizo suponer la presencia de impurezas provenientes de los solventes utilizados o del papel, localizados en dichas zonas. De hecho la localización de estos compuestos coincide o está muy cercana al frente de corrida del solvente (cfr. Figura 31). Finalmente, la mezcla 13, 31 proveniente de plantas tolerantes inhibió significativamente el CM.

Tabla XXXXI: Efecto de los principales compuestos fenólicos aislados de tallos susceptibles (II_S) y tolerantes (I) sobre el CM, al 7º día después de la inoculación (provenientes de 300 mg de PF inicial/ml de medio) (% respecto al crecimiento sobre medio basal).

Compuesto N°	E f e c t o		
	II _S	I	C
1,2	-10 ^a	-5 ^a	0
3,3',4	-16 ^a	-40 ^{b*}	0
5	NR	-7	0
25	NR	-11	0
6	-10 ^a	0 ^a	0
7	+4 ^a	-6 ^a	0
15,15'	-13 ^a	-13 ^a	0
19,20,39	-17 ^a	-17 ^a	0
21,22,26	-10 ^a	-5 ^a	0
30,33	-24 ^{a*}	-53 ^{c*}	-34 ^{b*}
33	NR	13	0
18,48,27	-37 ^{a*}	-46 ^{b*}	-34 ^{a*}
Fr	-25 ^{a*}	-28 ^{a*}	0
13,31	NR	-29 [*]	0
Ext. completo	-3 ^a	-60 ^b	NR

-: inhibición; +: promoción; NR: no realizado; C: cromatograma desarrollado sin siembra.

*: inhibición altamente significativa (P: 0,01)

Los valores son promedio de 3 bioensayos con 5 repeticiones cada uno. Promedios seguidos por letras distintas indican diferencias significativas (P: 0,01). La comparación solo es válida dentro de cada fila. Fr: zona difusa comprendida entre los R y 0 y 0,3 en la dirección B-Ac-A.

III.3.4.3. Identificación de los principales compuestos fenólicos

III.3.4.3.1. Compuestos 1 y 2

Las manchas 1 y 2 presentaron sobre las cromatografías en papel una fluorescencia celeste que viró a verde amarillento cuando los cromatogramas se expusieron a los vapores de amonio. El revelado con el reactivo de FeCl_3 produjo la aparición de manchas de color verde-grisáceo, característica propia de compuestos ortodihidroxifenólicos. No se produjeron reacciones de color al pulverizar los cromatogramas con el reactivo de Folin-Ciocalteu, pero si luego de exponer los papeles revelados a vapores de amonio. Las manchas también fueron reveladas positivamente con los reactivos de p-nitroanilina diazotizada, y AlCl_3 (cfr. Tabla XXXII). Todas las reacciones de color coincidieron con las que exhiben el ácido clorogénico y sus isómeros (Grodzinska-Zachwieja et al., 1967). De gran importancia resultó el empleo del reactivo de Hoepfner, ya que la aparición de un color amarillo luego del rociado con el nitrito de sodio, seguido del viraje a rojo brillante luego de la subsiguiente aplicación del hidróxido de potasio es una reacción específica del mencionado ácido (Kuć et al., 1956).

Los valores de R_f en los solventes B:Ac:A y Ac 2%, así como la fluorescencia coincidieron también con aquellos correspondientes al ácido clorogénico comercial (cfr. Tabla XXXII y XXXIV) (Hanson y Zucker, 1963).

El espectro de los compuestos 1, 2 en etanol 80%, a pH neutro presentó una absorción máxima a 325 nm y una mínima a 265 nm. El espectro del eluído acidificado (pH: 4) no difirió del anterior lo que indicó la ausencia de grupo carboxilo libre. Por el contrario el espectro del eluído a pH alcalino (pH: 11) sufrió un desvío batocrómico con una absorción máxima a 370 nm, propio de la presencia de grupos hidroxilo libres en posición meta o para (Figura 42). Todas estas características fueron idénticas a las del ác. clorogénico comercial y a las descritas en la bibliografía para dicho compuestos (Hanson y Zucker, op. cit.).

Como elemento adicional para la identificación de estos compuestos, que por todas las evidencias aportadas se habían identificado como los isómeros trans (comp. 1) y cis (compuesto 2) del ácido clorogénico se realizó una hidrólisis básica de los mismos (éster de los ácidos cafeico y quínico).

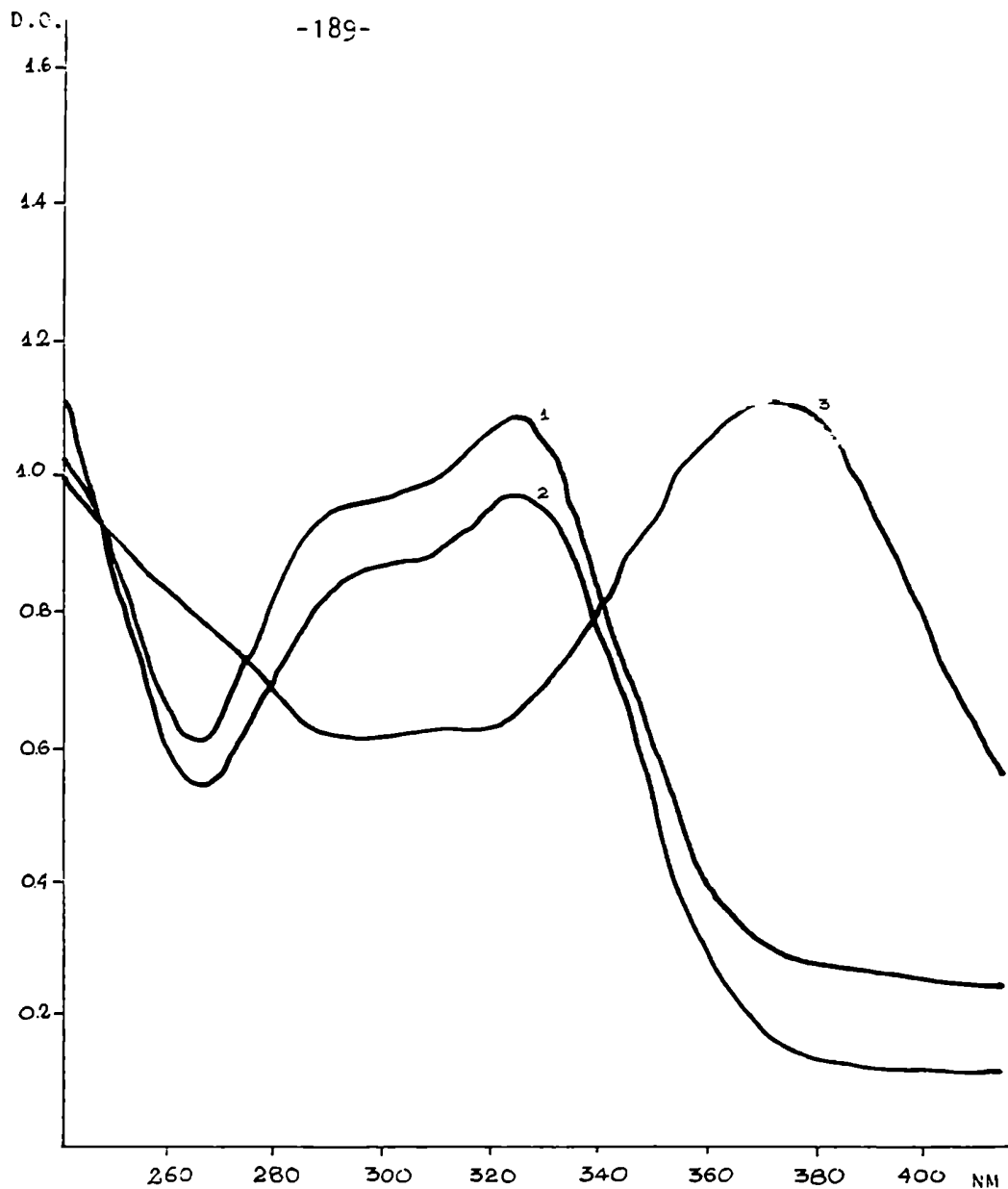


Figura 42: Espectros de absorción a la luz UV de la mezcla (1, 2) en metanol 80% a distintos pH neutro; 2: solución a pH 4 y 3: solución a pH 11.

La aglicona presente en las fases etereas luego de la hidrólisis se sembró en una placa delgada de celulosa y se desarrolló con B:Ac:A. Lo mismo se hizo con ácido cafeico comercial y con el producto de la hidrólisis básica del ácido clo. comercial. Los compuestos fenólicos obtenidos de ambas hidrolisis presentaron idénticos valores de Rf, una fluorescencia celeste que viró a celeste brillante al ser expuesta al amonio, y una reacción de color gris claro al ser revelados con el reactivo del ácido sulfanílico. En todos los casos su comportamiento fue igual al del ácido cafeico comercial (Figura 43 y Tabla XXXVI).

El estudio de los residuos unidos a las agliconas se llevó a cabo a través del método descrito en 11.2.5.2.2.3. Las características del residuo de la hidrólisis de los compuestos 1 y 2 fueron iguales a las del ácido quínico (Figura 44).

El resultado de todos los análisis realizados llevó a la identificación del ácido clorogénico. Este compuesto como se mencionara anteriormente ha sido descrito como uno de los fenoles más abundantes en los tallos sanos de girasol (Koepe et al., 1969; 1970 y 1975), y cambia en su concentración luego de la inoculación de la zona superior del tallo con el hongo Plasmopara halstedii (Cohen e Hibráhim, 1975).

111.3.4.3.2. Compuestos 3, 3' y 4

El color de la fluorescencia a la luz UV antes y después de la exposición a los vapores de amonio y las reacciones cromogénicas con los reactivos de Folin-Ciocalteu, $FeCl_3$, $AlCl_3$, p-nitroanilina diazotizada y, en especial, de Hoepfner y Vorsatz fueron idénticas a las del ácido clorogénico que se describieron en 111.3.4.3.1. Lo mismo ocurrió cuando se analizaron los espectros de absorción en soluciones de etanol 80% neutras, ácidas y alcalinas. La hidrólisis básica de estos compuestos rindió, al igual que la del ácido clorogénico comercial los ácidos cafeico y quínico (Figura 43 y 44). La característica fundamental que permitió discernir la identidad de estos compuestos como ácido isoclorogénico fue sus valores de Rf

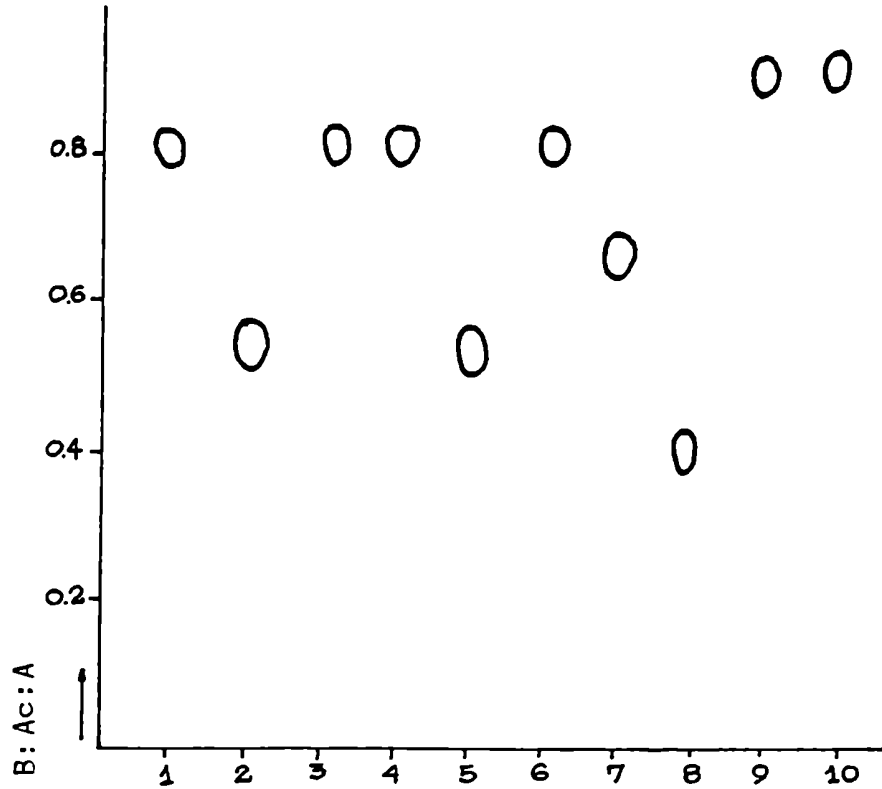


Figura 43: Comportamiento cromatográfico de ésteres fenólicos comerciales, compuestos fenólicos aislados de tallos, ácidos fenólicos libres comerciales, y productos de hidrólisis básicas, sobre placa de celulosa. 1: ác. cafeico comercial; 2: ác. clorogénico comercial; 3: ác. clorogénico comercial hidrolizado; 4: mezcla (1, 2) hidrolizada; 5: mezcla (1, 2) no hidrolizada; 6: mezcla (3, 3', 4) hidrolizada; 7: mezcla (3, 3', 4) no hidrolizada; 8: mezcla (15, 15') no hidrolizada; 9: ác. ferúlico comercial y 10: mezcla (15, 15') hidrolizada.

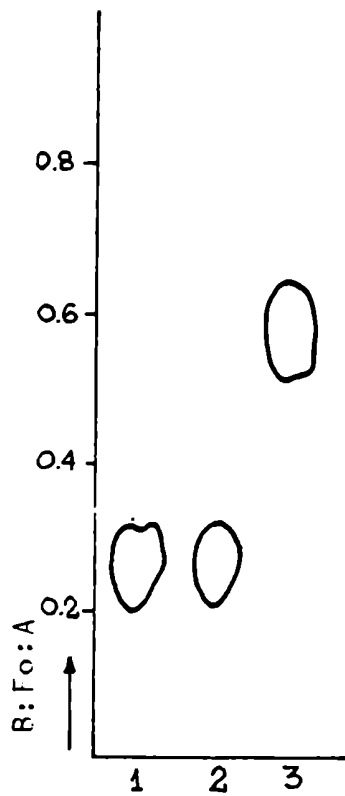


Figura 44: Comportamiento cromatográfico de ácidos orgánicos liberados de la hidrólisis de los compuestos (1, 2) y (3, 3', 4) (1), y del ác. quínico (2) succínico (3) comerciales, sobre placa de celulosa.

en los sistemas B:Ac:A y Ac 2%, ya que estos difieren de los del ácido clo. (Tabla XXXIII). Dichos valores coincidieron perfectamente con los descriptos por Hanson y Zucker (1963) para el ác. isoclorogénico.

El ácido isoclorogénico también ha sido citado como uno de los compuestos fenólicos más abundantes presentes en tallos de girasol (Koeppel *et al.*, 1969, 1970 y 1975). Se trata de una mezcla de tres ácidos dicafeoilquínicos (3-4; 4-5 y 3-5 dicafeoilquínico), de allí que se observen tres manchas sobre los cromatogramas.

III.3.4.3.3. Compuestos 15, 15'

Estos compuestos, al igual que los 1 y 2 no presentaron efecto significativo per se sobre el CM, sin embargo sufrieron una acumulación mayor en los tallos tolerantes (1) que en los susceptibles (II₅) (cfr. III.3.4.1).

Aparecieron sobre los cromatogramas como manchas violetas que viraban a azul verdoso al ser expuestas a los vapores de amonio. Al revelarlas con el reactivo de p-nitroanilina diazotizada surgieron como manchas violáceas a la luz visible (Tabla XXXII).

Al compararse el producto de la hidrólisis básica con marcadores comerciales se encontró que la aglicona de estos compuestos poseía idéntico valor de R_f sobre placa delgada de celulosa que el ácido ferúlico (en el sistema Ac 2%) (Figura 43); ambos compuestos poseían una fluorescencia azul intensa al ser observados bajo luz UV la que adquiría brillantez al ser expuesta a los vapores de amonio. Tanto el ácido ferúlico como la aglicona de los compuestos 15, 15' adquirieron un color pardo rojizo a la luz visible cuando se los reveló con el reactivo del ácido sulfanílico. Todas estas evidencias permitieron afirmar que estos compuestos eran ésteres del ácido ferúlico.

Como no se realizó un estudio de los residuos unidos al ácido no fue posible verificar si el mismo está unido a un azúcar o ácido orgánico. Sin embargo el estudio de los espectros a la luz UV mostró una estrecha coincidencia con respecto al éster de ácido ferúlico y ácido quínico (Hanson y Zucker, 1963). En ambos casos los compuestos exhibieron una absorción

máxima a 328 nm, una absorción mínima a 265 nm (a pH neutro) y un desvío batocrómico del pico de absorción máxima de 45 nm (Figura 45) a pH básico.

Por el contrario los valores de Rf en B:Ac:A de los compuestos 15 y 15' difirieron completamente del valor de otro derivado del ferúlico que es el éster con el ácido tartárico (Ribereau-Gayon, 1972). Mientras los valores de los compuestos a identificar tuvieron un promedio de 0,34 y 0,40 el mencionado éster posee un Rf de 0,64 según Ribereau-Gayon (op. cit.) (Tabla XXXVII).

En consecuencia los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que podría tratarse de ésteres del ácido ferúlico y quínico.

III.3.4.3.4. Otros compuestos

Una característica peculiar del ácido cumárico y sus ésteres (Hanson y Zucker, 1963) con respecto a otros ácidos fenólicos y derivados es la de no fluorescer al ser expuestos a la luz UV y emitir una fluorescencia azul o violeta al ser sometidos a la presencia de vapores de amonio. Los únicos compuestos que mostraron dichas características fueron los denominados 19, 20 y 39 (Tabla XXXII). Por otro lado los valores de Rf en los sistemas B:Ac:A y Ac 2% son semejantes a aquellos obtenidos de la bibliografía para los distintos ésteres del ácido cumárico (Tabla XXXXII).

La propiedad de los compuestos 45 y 47 de no ser visibles bajo UV ni antes ni después de su exposición al amonio, y de adquirir un color violeta a la luz visible luego de la revelación con p-nitroanilina diazotizada sugiere que se trataría de derivados del ácido vainílico (Ribereau-Gayon, op. cit.). De igual modo, el compuesto 46 no era visible bajo la luz UV y adquirió un color azul a la luz visible al revelar con el mencionado reactivo. Esto sugirió que podía tratarse de un derivado del ácido siríngico.

Las mezclas 30, 33 y 18, 48, 27 no fueron analizadas debido a que se consideró que podrían estar contaminadas con impurezas de los solventes (cfr. III.3.4.2.).

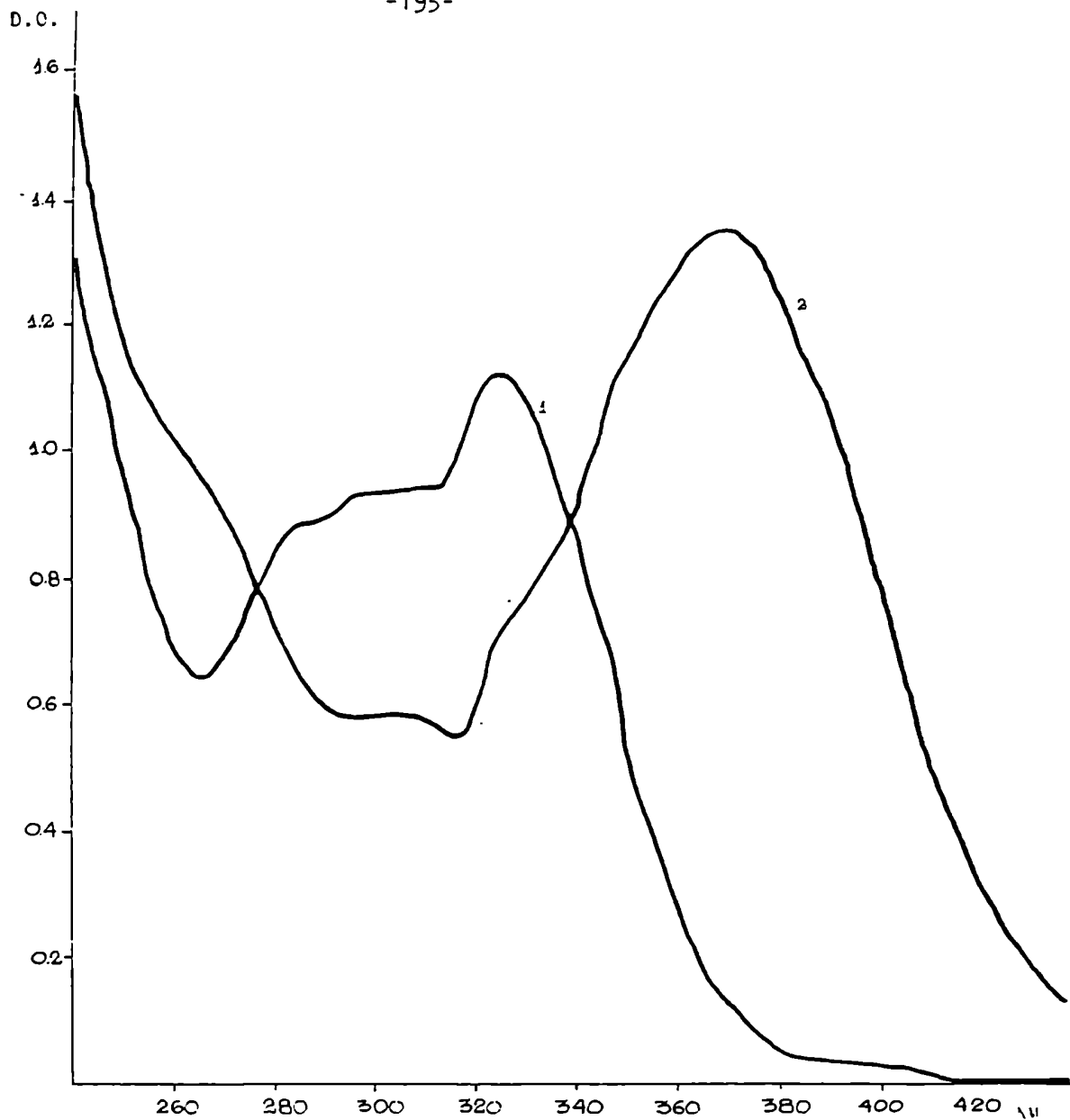


Figura 45: Espectro de absorción a la luz UV de la mezcla (15, 15') en metanol 80% a distintos pH. 1: solución neutra y ácida (pH 4); 2: solución básica (pH 11).

Tabla XXXIII: Características de derivados de los ácidos ferúlico y cumárico.

Compuesto	Rf B-Ac-A (6:1:2)	Ac 5%	UV	UV + NH ₃	Referencia
Acido p-cumaril quínico	0,71		No	Azul	Ribereau-Gayon (1972)
Acido mono p- cumaril tartárico	0,69		No	Violeta	Ribereau-Gayon (1972)
3-0-p-cumaril quínico	0,78	0,70; 0,80	No	Azul brillante	Hanson y Zucker (1963)
19, 20	0,70	0,74; 0,80	No	Azul	
39	0,74	0,84	No	Celeste fuerte	
Mono ferulil tar- tárico	0,64		Azul	Azul verde	Ribereau-Gayon (1972)
15, 15'	0,40; 0,34	0,07; 0,24	Violeta	Azul verde	

III.3.4.4. Determinación de la concentración del ácido isoclorogénico que ocasiona una inhibición del 50% (CI 50).

De los experimentos anteriores se desprendió que el compuesto de mayor efecto inhibitor del CM, y que se acumulaba en mayor proporción en los individuos tolerantes era el ácido isoclorogénico (cfr. III.3.4.1; III.3.4.2 y III.3.4.3).

Una condición indispensable que quedaba por probar para poder establecer que este compuesto se relaciona con la defensa es que el mismo se halle en los tejidos en las cantidades necesarias para ejercer su efecto deletéreo sobre el patógeno. Para ello es necesario establecer las concentraciones mínimas inhibitoras del compuesto.

La mezcla 3, 3', 4 se aisló de un gran número de cromatogramas. Su concentración en los eluidos se determinó aceptando que el coeficiente de extinción milimolecular de dicho compuesto es 40 (Coerse et al., 1965). Distintas concentraciones del ácido isoclorogénico se incorporaron a un medio mineral definido (II.2.1). A medida que se incrementó la concentración del mencionado compuesto en los medios de cultivo el efecto inhibitor se hizo mayor y alcanzó un valor del 50% (CI 50) con una concentración de 0,3 mg/ml de medio (Figura 46), al 7º día después de la inoculación. Por el contrario, un compuesto tan afin como el ác. clorogénico no produjo efectos significativos sobre el CM, al menos a las concentraciones empleadas (Figura 46).

Al analizar la velocidad del crecimiento fúngico en función del tiempo de inoculación se encontró, utilizando 0,3 mg de ácido isoclorogénico/ml, que la velocidad se reduce en un 50% hasta el 7º día pero luego el crecimiento prácticamente cesar, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los promedios de los crecimientos al 7º y 8º día ni al 8º y 9º día (Figura 47). Cuando se utilizó 0,6 mg/ml, el inicio del crecimiento se retardó 3 días respecto al testigo y la colonia alcanzó al 5º día un radio promedio que se mantuvo constante hasta el final del experimento (11º día) (Figura 47).

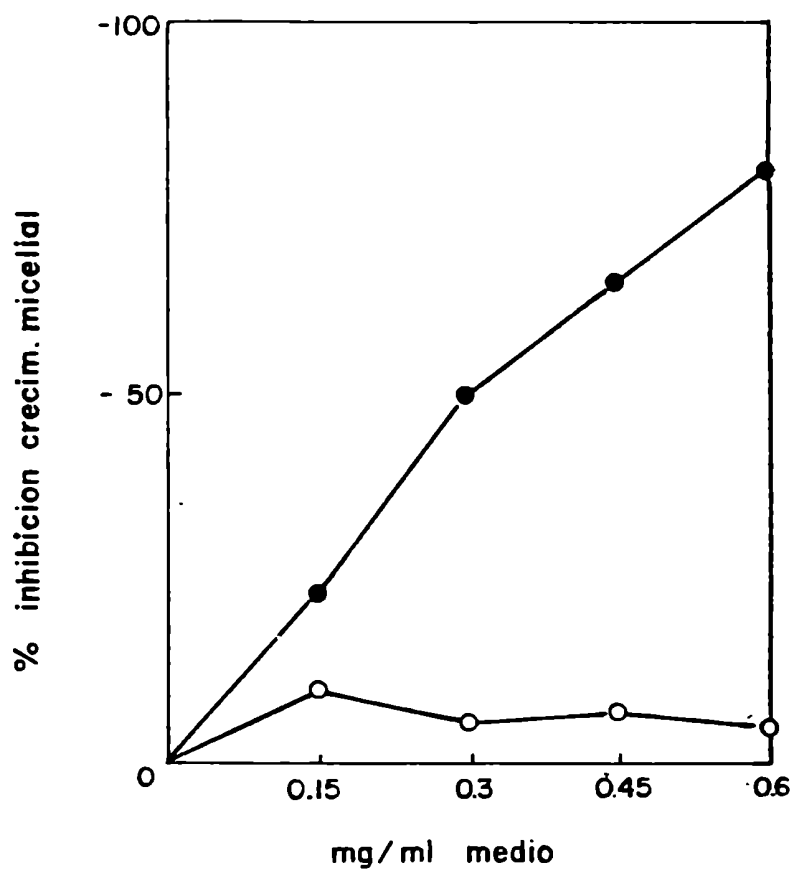


Figura 46: Efecto inhibitor de diferentes concentraciones de ác. isoclorogénico (o) y ác. clorogénico (●), sobre el crecimiento micelial. (% de inhibición respecto al crecimiento en el medio basal, al 7º día de la inoculación). Los valores son promedio de 6 repeticiones.

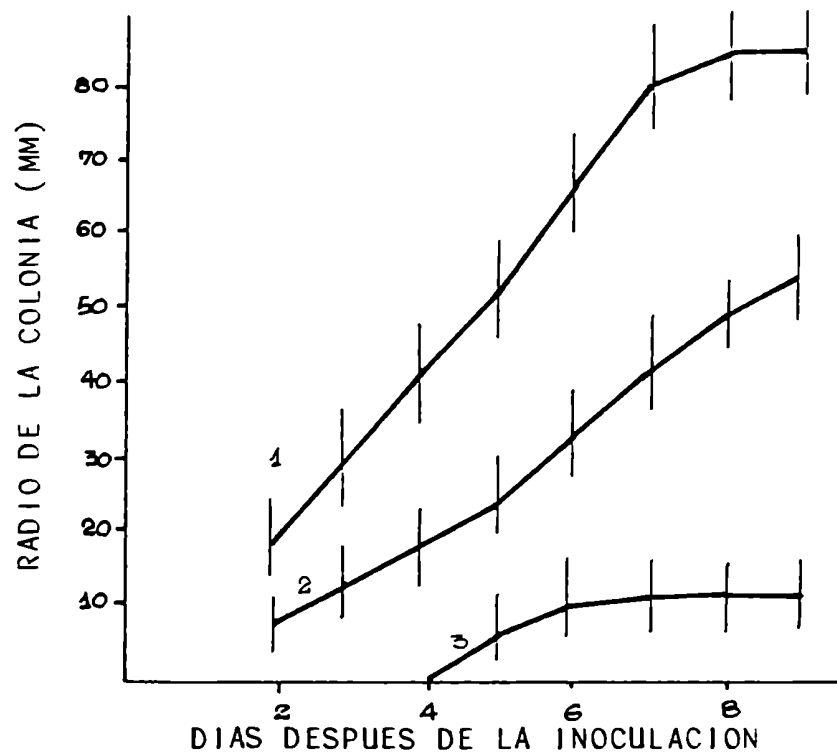


Figura 47: Crecimiento micelial en función del tiempo de inoculación sobre un medio basal (1) y sobre dicho medio más el agregado de 0,3 (2) y 0,6 (3) mg de ác. isochlorogénico/ml. Los valores son promedio de 6 repeticiones.

III.3.4.5. Cuantificación del ácido isoclorogénico in vivo

Como se mencionó en el punto anterior era necesario comprobar si la concentración del ácido isoclorogénico en los tallos toler: se hallaba por encima de los umbrales mínimos de inhibición que se determinaron en III.3.4.4.

Se cuantificó la concentración de este compuesto en las zo: L de tallos de las distintas edades, cultivados en cámara bioclimática

III.3.4.5.1. Cálculo del factor de corrección para la expresión de la concentración sobre la base del peso de los tejidos que contienen fenoles

El estudio de la localización anatómica de los fenoles solubles mostró que la proporción de tejidos que realmente contenían dichos compuestos parecía variar con la edad. De ser así, expresar las concentraciones sobre la base del peso fresco total de tejido inicial podía llevar a resultados erróneos. Por lo tanto se intentó corregir dicha expresión por medio del cálculo de tejido "cortical" (C) para cada edad. Esto se logró restando al peso inicial del tejido el peso del tejido xilemático. El tejido C comprendía en las edades II y IV la corteza y el floema y en el estadio I la corteza, el parénquima interfascicular y el floema. Como se describiera en el punto III.3.7 dichos tejidos son los que contienen a los fenoles solubles.

Se empleó el método descrito en II.2.5.2.2.2.c. Efectivamente, el porcentaje de xilema respecto al peso fresco inicial (en el que nunca se incluyó la médula) aumentó con la edad de la planta (Tabla XXXIII). Esto concuerda con el hecho que el crecimiento secundario en los tallos (III.4) se incrementa al crecer la planta.

Tabla XXXXIII: Volúmenes relativos (%) de los distintos tejidos en las zonas de tallo que contenían las lesiones para cada estadio (la médula no se incluye en ningún caso).

	I	II _S	Estadio II _T	IV
Tejidos que contienen fenoles: parénquima cortical e interfasci- cular, floema y cambium (C)	67	65	62	53
Xilema	33	35	38	47

Los valores son promedio de 3 repeticiones.

I: vegetativo; II_S: indiv. susceptibles, con botón floral cerrado; II_T: indiv. tolerantes con botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

III.3.4.5.2. Valores corregidos y no corregidos

No se hallaron diferencias significativas entre las concentraciones del ácido isoclorogénico en las plantas sanas de los distintos estadios (Tabla XXXIV).

En las plantas inoculadas de todos los estadios a excepción del II₅, se produjo un incremento altamente significativo del ácido isoclorogénico respecto a los correspondientes testigos (Tabla XXXIV). El contenido del compuesto inhibidor fue similar en las edades I y II_T y menor en el estadio IV.

Es importante llamar la atención sobre el punto que la concentración del ácido isoclorogénico en las L de las edades tolerantes supera en todos los casos la CI 50 determinada (0,3 mg/ml de medio). Esto no ocurre en los individuos susceptibles.

Si bien la expresión de los valores respecto a los tejidos C no modifica la significación de las diferencias entre tratamientos, es interesante señalar que mientras en el estado IV las concentraciones corregidas superan aún en mayor medida la CI 50, la concentración corregida en II₅ no alcanza tal valor.

Debe recordarse que no necesariamente siempre las CI in vitro coinciden con las CI in vivo, debido a que el efecto de un determinado compuesto puede verse incrementado o reducido al interactuar con el "medio" particular en que se encuentre en cada tejido. Sin embargo el hecho que la concentración del ácido isoclorogénico supere ampliamente las CI 100 (cfr Figura 47 y Tabla XXXIV), en todas las L de los individuos tolerantes independientemente de su edad, y que no alcance la CI 50 en las de los individuos susceptibles, aporta fuerza a la hipótesis de su función en los mecanismos de defensa.

El ác. isoclorogénico, al contrario que el ác. clorogénico, no ha sido muy estudiado en relación con la resistencia a enfermedades. Se acumula junto con el ác. clorogénico, cafeico, escopoletina, esculetina, umbeliferona e ipomeomaronona en raíces de batata en respuesta a la infección fúngica, heridas o tratamientos con compuestos químicos (Akazawa y Wada, 1961). Dicha acumulación es más rápida en raíces resistentes a Ceratocystis fimbriata que en las susceptibles. Sin embargo, estos compuestos no

Tabla XXXXIV: Concentración del ácido isoclorogénico en las zonas de lesión y tejidos similares de tallos testigos, de las distintas edades (mg/gr). Los datos se refieren respecto al peso fresco total de tejidos extraído (NC) y al peso fresco de tejido que realmente contiene fenoles (C) (mayores aclaraciones en el texto).

		Estadio			
		I	II _S	II _T	IV
Testigo	NC	0,09 ^b	0,05 ^b	0,05 ^b	0,03 ^b
	C	0,134 ^b	0,08 ^b	0,08 ^b	0,06 ^b
Inoculadas	NC	1,40 ^d	0,11 ^{bc}	1,35 ^d	0,45 ^c
	C	2,09 ^d	0,18 ^{bc}	2,18 ^d	0,84 ^c

Los valores son promedio de 3-4 repeticiones (3-4 plantas/repetición). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos al 1%. Las comparaciones son válidas dentro y entre filas y columnas.

I: vegetativo; II_S: indiv. susceptibles con botón floral cerrado; II_T: indiv. tolerantes con botón floral cerrado; IV: botón floral abierto.

son inhibidores del CM de ese hongo a concentraciones considerablemente mayores que las encontradas en los tejidos infectados. Esto no elimina, según los autores, la posibilidad de que los productos de oxidación o degradación de estos ácidos posean efectos tóxicos in vivo. Otra posibilidad que consideran es que los ácidos o sus derivados posean un rol indirecto en la resistencia basado en sus efectos sobre el metabolismo vegetal. Por ejemplo, Tomiyama et al., (1967) han sugerido que los productos de la oxidación de los ácidos clorogénico y ascórbico son inhibidores de la aldolasa y estimulan el desvío del camino metabólico de la respiración al de las pentosas, con el consecuente incremento de la síntesis fenólica.

Kirkham (1957) estudió la relación de los fenoles del peral y el manzano con la sarna producida por Venturia inaequalis y V. pirina, respectivamente. Este autor encontró que tanto el ác. clorogénico como el isoclorogénico poseían efectos tóxicos sobre estos patógenos y que su acción era sinérgica; adjudicó una gran importancia a la proporción entre ambos ácidos y a la interacción de estos con los compuestos nitrogenados.

Con respecto al ác. clorogénico, son muchos los casos en que se ha encontrado una correlación entre el contenido del mismo en los tejidos y la resistencia a enfermedades parasitarias (Schaal et al., 1952; Lee et al., 1958; Mc Clean et al., 1961; Kuć, 1972; Patil et al., 1966). En otras situaciones por el contrario este compuesto por si solo no sería capaz de explicar la tolerancia a determinadas enfermedades (Kuć, 1957). Más aún 0,1 a 0,2% de ác. clorogénico estimula el crecimiento de P. infestans y a concentraciones menores el de Fusarium solani var. caeruleum (Friend, 1957).

III.3.5. Efecto de los ácidos fenólicos libres sobre el CM, determinación de sus CI 50.

La acumulación en las L de los tallos tolerantes no solo del ác. isoclorogénico sino también de un número de otros ésteres no inhibidores per se llevó a pensar que estos podrían tener una relación aunque indirecta en la defensa. Como se indicó en el punto 1.3.3.3.6 ciertos antibióticos

constitutivos deben sufrir transformaciones para adquirir su toxicidad frente a los microorganismos patógenos. Dentro de este tipo de reacciones se destacan la hidrólisis y la oxidación. Dado que se había logrado identificar las principales agliconas liberadas a través de la hidrólisis básica de los extractos provenientes de las L de los tallos tolerantes (III.3.3.2.1.2 y III.3.3.2.2.2.) se estudió el efecto de las mismas sobre el CM.

Se analizaron diversas concentraciones (0,1; 0,2; 1 y 2 mg/ml de medio de cultivo) de los ácidos cafeico (caf), cumárico (cum.), ferúlico (fer.), vainílico (vai.) y p-hidroxibenzoico (p-OH) adquiridos comercialmente. A fines comparativos se empleó también el catecol (cat.) y el ác. clorogénico (clo.).

Todos los compuestos produjeron efectos inhibidores a excepción del ác. clo. Dichos efectos aumentaron al incrementarse la concentración en los medios. Los CI 50% al 7º día de la inoculación en medio AM 0,1% (Fig. 48) se lograron con las siguientes cantidades de productos (en mg/ml): 0,1 para los ác. vai. y cat; 0,5 para el cafeico y 1,0 para los ác. ferúlico y p-hidroxibenzoico.

Como puede observarse las CI 50 del vai. y caf. se encuentran en el orden de la concentración determinada para el ác. isoclorogénico (III.3.4.4.). Por el contrario el resto de los ácidos libres necesitan estar más concentrados para producir una acción semejante.

En cuanto al tipo de alteración que los ácidos fenólicos produjeron sobre el CM se pudo distinguir 4:

- El micelio no creció en absoluto: concentraciones de cat. y vai. inferiores al 1 mg/ml de medio (Figuras 51 y 52).
- Retardo en el inicio del crecimiento: 2 mg/ml de ácido cafeico (Figura 52).
- El crecimiento se detuvo a partir del 2º o 4º día después de la inoculación: 0,1 y 0,2 mg/ml de cat. y vai.; 1 mg/ml de fer y 1 y 2 mg/ml de caf.; 2 mg/ml de pOH (Figuras 49, 50, 51 y 52).
- Ningún tipo de efectos: 0,1 mg/ml de caf, pOH y clo; 0,2; 1 y 2 mg/ml de clo (Figuras 49, 50, 51 y 52).

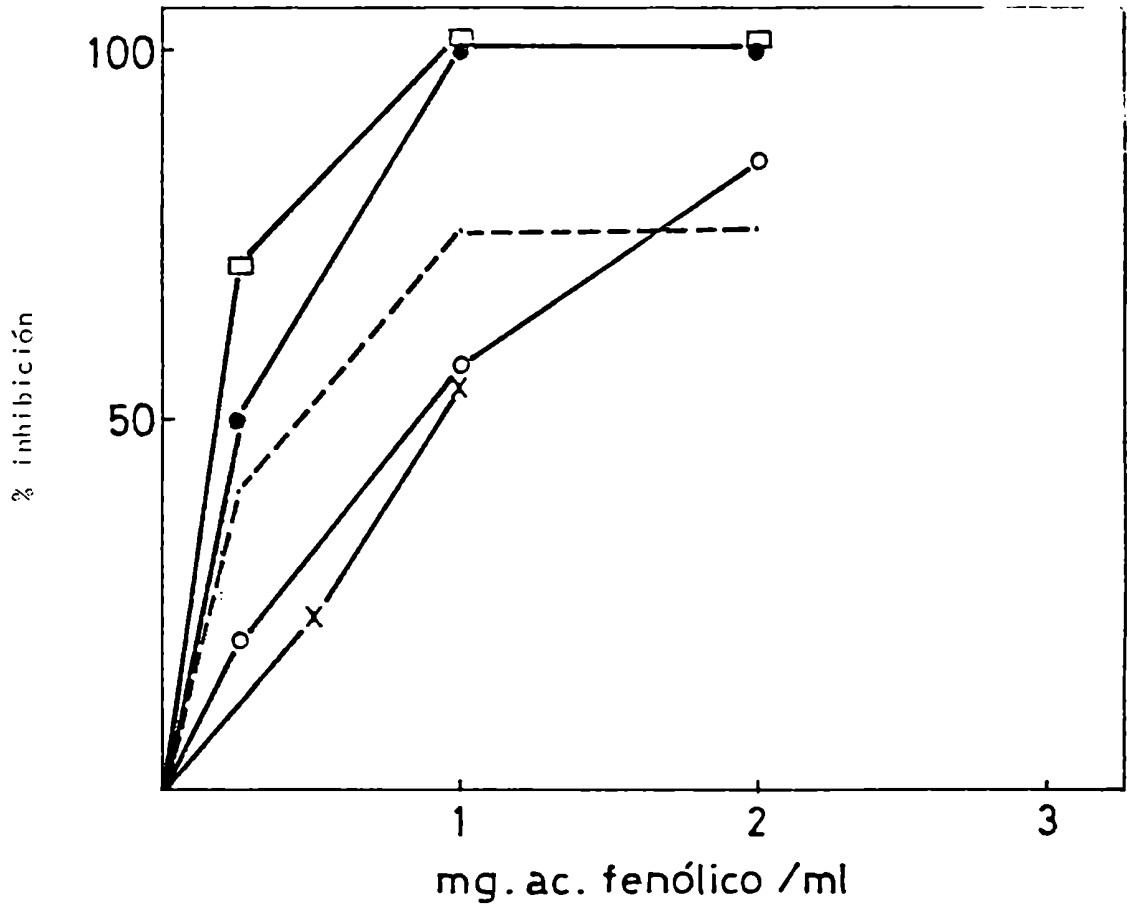


Figura 48: Efecto inhibitor de diferentes concentraciones de ác. fenólicos comerciales, sobre el crecimiento micelial (% de inhibición respecto al crecimiento en el medio basal, al 7º día de la inoculación). : catecol; o: vainílico; ---: cafeico; 0—0: p-hidroxibenzoico y x—x: ferúlico. Los valores son promedio de 8 repeticiones.

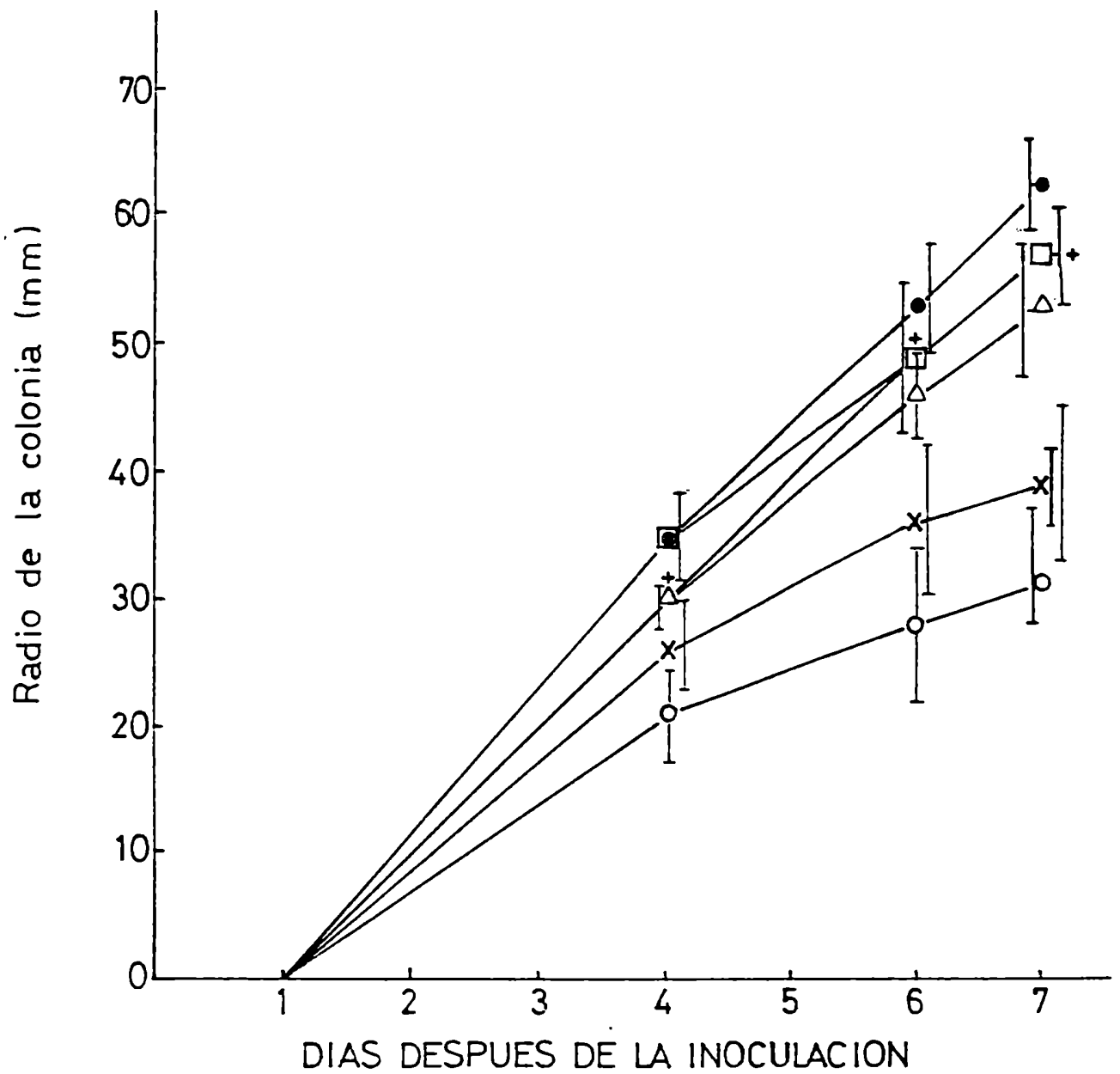


Figura 49: Crecimiento micelial en función del tiempo de inoculación sobre un medio basal (o), y en dicho medio más el agregado de 0,1 mg/ml de ác. clorogénico (□), ác. p-hidroxibenzoico (+), ác. cafeico (Δ), ác. vainílico (x) y catecol (o). Los valores son promedio de 8 repeticiones.

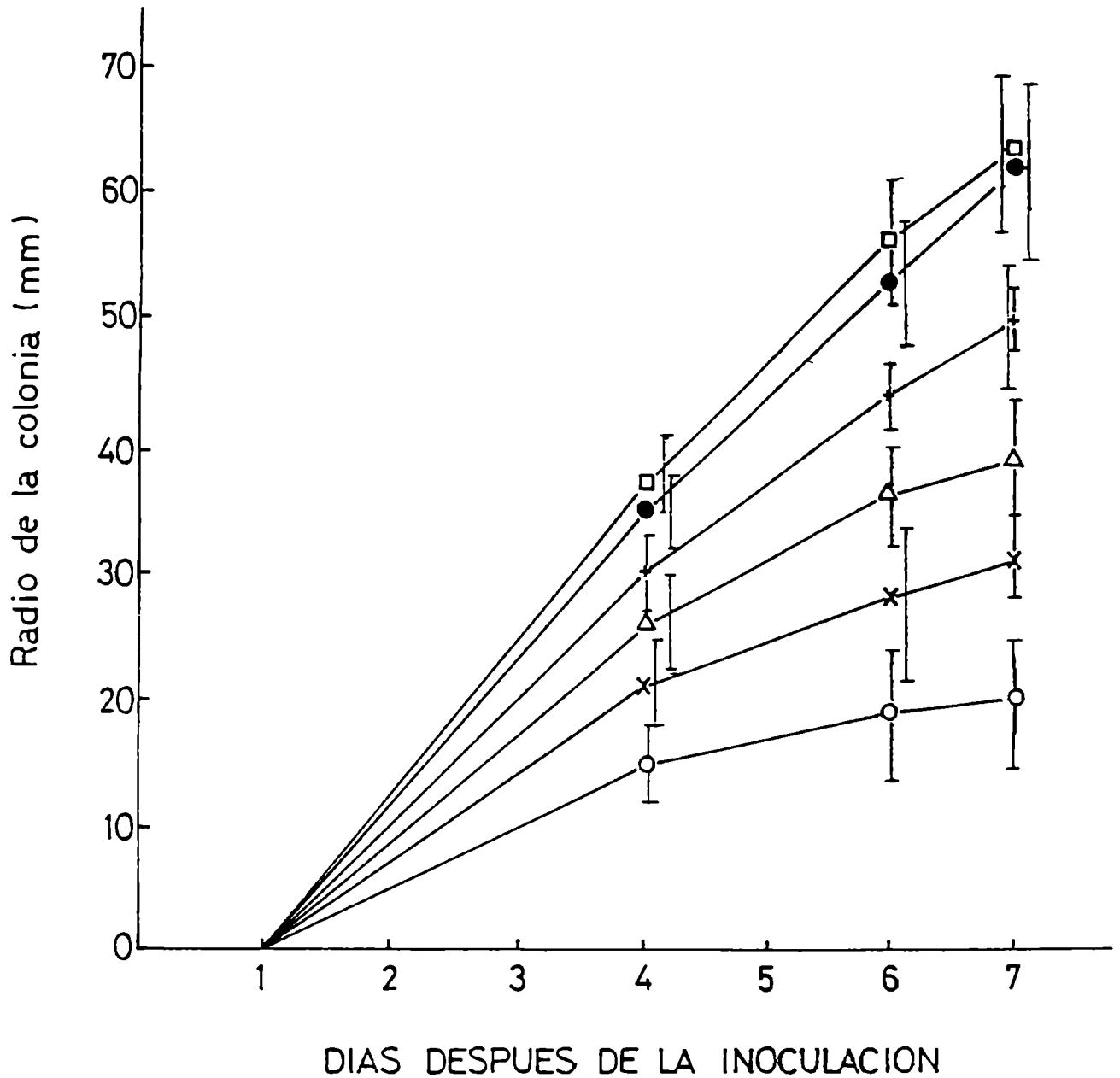


Figura 50: Crecimiento micelial en función del tiempo de inoculación sobre un medio basal (o), y en dicho medio más el agregado de 0,2 mg/ml de ácido clorogénico (□), ácido p-hidroxibenzoico (+), ácido cafeico (Δ); ácido vainílico (x) y catecol (o). Los valores son promedio de 8 repeticiones.

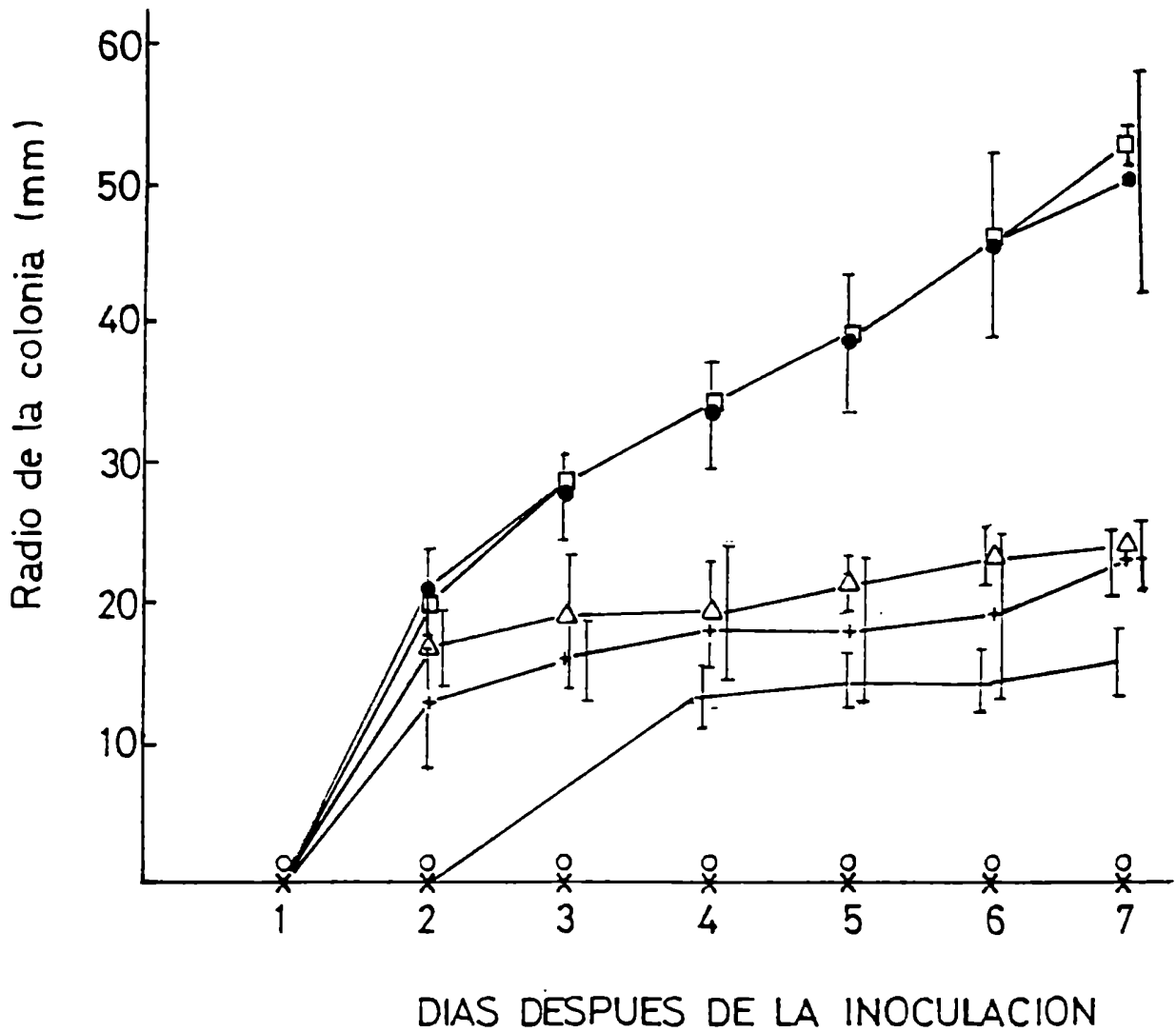


Figura 51: Crecimiento micelial en función del tiempo de inoculación sobre un medio basal (o), y en dicho medio más el agregado de 1 mg/ml de ácido clorogénico (), ácido p-hidroxibenzoico (+), ácido cafeico (Δ), ácido vainílico (x) y catecol (◊). Los valores son promedio de 3 repeticiones.

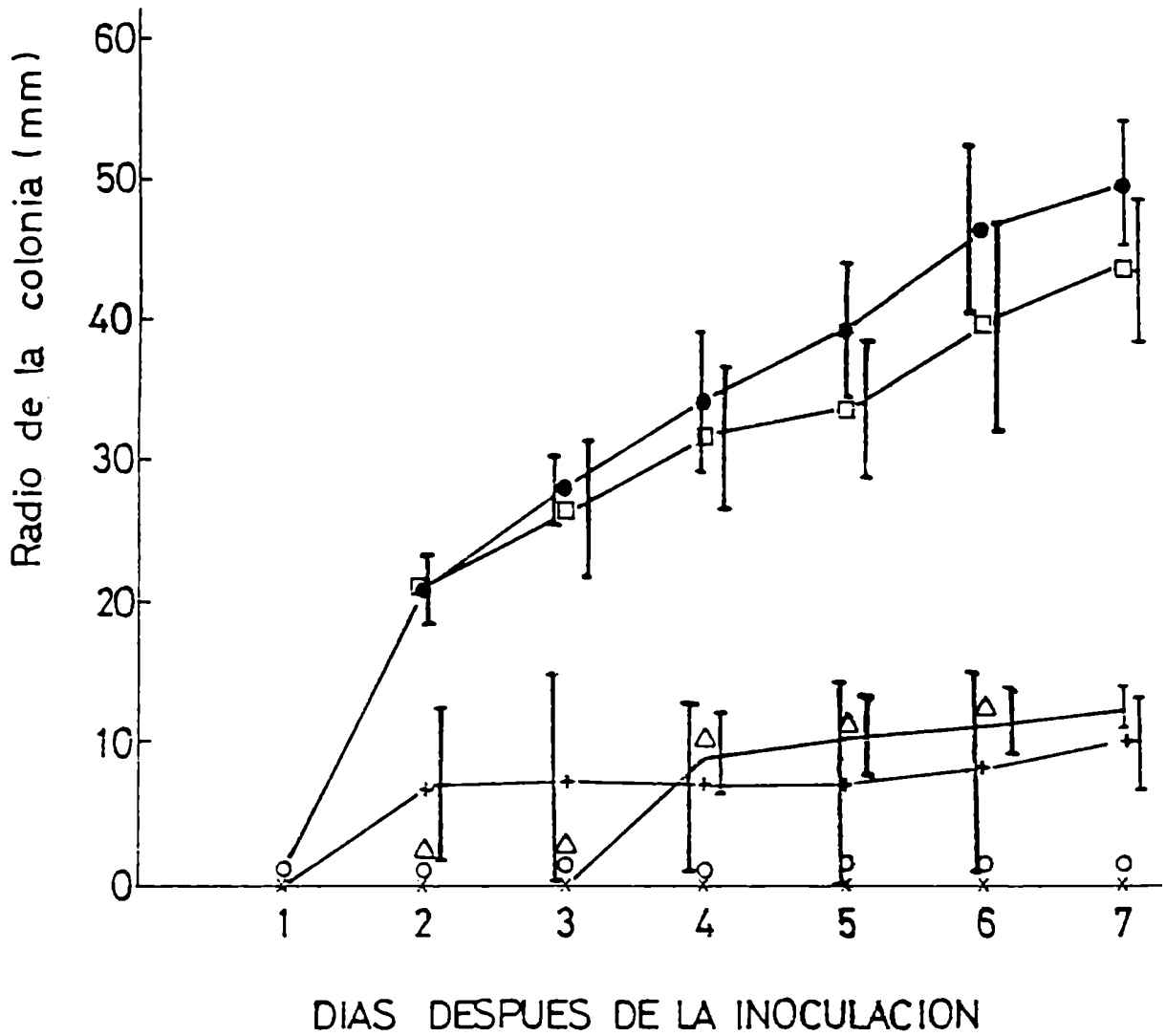


Figura 52: Crecimiento micelial en función del tiempo de inoculación sobre un medio basal (o), y en dicho medio más el agregado de 2 mg/ml de ácido clorogénico (□), ácido p-hidroxibenzoico (+), ácido cafeico (Δ), ácido vainílico (x) y catecol (o). Los valores son promedio de 3 repeticiones.

La repetición de los ensayos biológicos con medio mineral definido en lugar de AM 0,1% arrojó prácticamente los mismos resultados. Se probó además el efecto del ácido cumárico cuyo CI 50 resultó 1 mg/ml.

Los ácidos p-hidroxibenzoicos han sido hallados en tejidos vegetales enfermos (Friend, 1977). En dos interacciones hospedante-patógeno: manzano atacado por S. fructigena (Fawcett et al., 1968) y en cultivos de células de papa infectados con P. infestans (Friend, 1971; Robertson et al., 1968) se encontraron concentraciones antifúngicas de los ácidos p-hidroxibenzoico, salicílico y vanílico. En la primera interacción los tres ácidos serían sintetizados por el hongo a partir de precursores producidos por el hospedante tales como el ácido clorogénico (Fawcett, op. cit.). Los mencionados fenoles se hallan en forma combinada (probablemente como glucósidos) en células de papa resistentes antes de la infección (Robertson et al., 1969).

Como se mencionara, el ácido cafeico se acumula en tejidos de papa infectados y es responsable de la inhibición del crecimiento de patógenos tales como Myrothecium verrucaria y Fusarium solani f. radicicola (Kuč, 1957). También se acumula en hojas de maíces resistentes y susceptibles a Colletotrichum graminicola pero no posee efectos perjudiciales sobre este hongo, al menos en el rango de concentraciones ensayadas (Hammerschmidt y Nicholson, 1977).

Los resultados obtenidos permiten concluir que las agliconas de todos los ésteres fenólicos que se acumulan en las L de los individuos de girasol tolerantes poseen efecto inhibidores del CM que van desde la reducción de la velocidad del crecimiento, el retardo del inicio del mismo hasta la reducción total del CM. Dichos efectos dependen de las concentraciones de los compuestos en los medios y estas a su vez de cada producto.

Se puede proponer entonces que dichas agliconas, liberadas por hidrolasas de origen fúngico o del hospedante, podrían intervenir en la defensa. Restaría comprobar fundamentalmente la presencia de estas enzimas en los tejidos y la velocidad de liberación de los productos activos para fortalecer esta idea. La no acumulación de ácidos fenólicos libres, hecho que se podría esperar de producirse la hidrólisis de los ésteres, no es de extrañar ya que estos compuestos o sus radicales libres constituyen metabolitos intermediarios de vida media muy corta dada su condición altamente reactiva (Bell, 1981).

III.3.6. Observaciones acerca de la oxidación de los medios de cultivo

Durante el transcurso de todo este trabajo se observaron dos tipos de alteraciones en los tubos donde se realizaron los bioensayos: un oscurecimiento del medio de cultivo por debajo de la mata micelial, y la melanización de las hifas vegetativas.

En el primer caso la alteración siempre se originó en la zona correspondiente al inóculo y desde allí se extendió hacia el margen de crecimiento del micelio. Nunca estuvo presente en los medios sin agregados. La intensidad y extensión del oscurecimiento (castaño rojizo) varió con los distintos compuestos adicionados.

En el caso de la incorporación de extractos completos que contenían por debajo de 1 mg de fenoles totales/ml no se produjeron oxidaciones independientemente del origen, a excepción de ciertos medios con extractos inhibidores del estadio IV inoculado. Cuando el medio contuvo más de 1 mg/ml, el hongo indujo una alteración del color del mismo cuya extensión e intensidad se incrementó al aumentar el contenido de fenoles en el medio y por ende el efecto inhibitor.

Los únicos compuestos que indujeron una oxidación por parte del hongo fueron las distintas combinaciones de 1, 2, 3, 3', 4, 21, 22 y 26. A igualdad de concentraciones (0,3 mg/ml) la oxidación fue muy leve con 1, 2, 21, 22, 26 y castaña rojiza fuerte con 3, 3', 4 (ác. isoclorogénico).

El empleo de altas concentraciones de ác. clorogénico comercial (3,5 a 5 mg/ml) no fueron inhibitoras del CM sin embargo indujeron una leve oxidación castaño verdosa a castaño rojiza clara. En los casos de las concentraciones más altas los primordios de esclerocios poseían un color verdoso lo que sugería su empleo en la síntesis de melaninas que cubren a los mismos. Los ác. comerciales cafeico, ferúlico y catecol produjeron una leve alteración del medio a concentraciones mayores o iguales a 1 mg/ml.

Con respecto al segundo tipo de alteración se la observó únicamente en los medios con el agregado de cafeico (2 mg/ml) y catecol (1 y 2 mg/ml).

Puede generalizarse a partir de estos resultados que siempre que el hongo produce una fuerte alteración del medio de cultivo, el efecto de este es altamente inhibitor del CM. Los ensayos con compuestos aislados indican

una oxidación preferencial del isoclorogénico, es decir del compuesto con mayor efecto tóxico presente in vivo. Lo contrario no siempre es cierto, ya que ciertos medios altamente inhibidores no se alteran o lo hacen muy levemente (caso de ác. fenólicos libres y extractos completos que contenían menos de 1 mg de fenoles totales/ml). Esto podría interpretarse como la capacidad del hongo de oxidar in vitro ciertos fenoles lo que al menos solo se visualiza cuando estos se encuentran por encima de determinadas concentraciones.

La oxidación de fenoles fungitóxicos por parte de un patógeno, puede resultar en productos aún más tóxicos que sus precursores (radicales libres y quinonas) (Bell, 1981). En ciertas interacciones dichos compuestos son polimerizados a melaninas inactivas para ese determinado patógeno, a través de polifenoloxidasas (PPO) (Kritzman y Chet, 1980).

Las interacciones girasol-S. sclerotiorum tolerantes se caracterizaron sin excepción por el oscurecimiento de las lesiones (III.1.4). Esto se debería a la oxidación de los fenoles por PPO del hongo y/o de la planta. Marciano et al. (1983) demostraron que aislamientos virulentos de S. sclerotiorum producen mayores cantidades de ác. oxálico y que este compuesto a pH 4 es inhibidor de la actividad de las PPO presentes en los tallos sanos de girasol. Es importante agregar que si el pH del medio es igual a 6 es necesaria una concentración 10 veces mayor de oxálico para producir igual efecto inhibidor de PPO. La determinación de los pH en los jugos vegetales (Tabla 45) demostró que en los estadios tolerantes se acercan a 6 y en el susceptibles a 4 (II₅).

El hecho de que la inhibición de la oxidación de los fenoles se relacione con la susceptibilidad (lesiones claras, III.1.4) (Marciano et al., op. cit.) sugiere que los compuestos oxidados podrían ser más tóxicos que los no oxidados. Sin embargo cabe la posibilidad de que la oxidación sea una mera consecuencia del exceso de fenoles en el medio no alterando substancialmente el efecto de estos compuestos.

El estudio de la acción de los productos de oxidación de los fenoles que se acumulan en las lesiones de los individuos tolerantes sobre el CM sería de fundamental importancia para aclarar estos puntos.

Tabla XXXV: Ph del jugo celular extraído de distintas zonas de tallos inoculados y testigo, de diferentes edades.

	E s t a d i o s					
	I		II		IV	
	Testigo	Inoculado	Testigo	Inoculado	Testigo	Inoculado
				II _T	II _S	
L	6,69 ^a	5,98 ^a	6,43 ^a	5,7 ^a	4,6 ^b	6,26 ^a 5,5 ^{ab}
SA		6,9 ^a			6,34 ^a	

L: lesiones; SA: sana adyacente; -: no realizado.

I: vegetativo; II: botón floral cerrado; IV: botón floral abierto. Los valores son promedio de 3-4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas al 5%. Las comparaciones son válidas dentro y entre filas y columnas.

Como quedó demostrado en III.1.4 y III.4.3, la tolerancia se relaciona con la melanización temprana de los tejidos, en especial de aquellos que limitan las lesiones. Este evento se produjo independientemente de la edad del tallo y origen del material. Beckman et al. (1974) demostraron que paredes artificiales de pectina-oxalato de calcio impregnadas con productos de oxidación de 3-hidroxi tiramina son resistentes a la degradación por ácido oxálico y por Fusarium oxysporum f. sp. cubense. Por el contrario, las membranas no impregnadas eran destruidas por el oxálico. De igual modo, la impregnación natural de las placas perforadas de los vasos de las raíces del banano con productos de oxidación similares confiere resistencia a la degradación por oxálico (Friend, 1977). Ambos trabajos aportan una fuerte evidencia al eventual papel de las melaninas como protector frente al ácido oxálico. Anteriormente se había demostrado que dicho compuesto se relaciona con la degradación de paredes celulares por Sclerotium rolfsii y, como se describiera en los antecedentes bibliográficos, constituye la principal toxina de Sclerotinia sclerotiorum y actúa sinérgicamente con las enzimas degradativas del hongo.

III.3.7. Localización histoquímica de los fenoles en los tallos

Otro aspecto fundamental dentro del estudio de los compuestos fenólicos fue su localización anatómica en los tallos susceptibles y tolerantes. Los objetivos principales fueron detectar la presencia de estos compuestos en las zonas de penetración del patógeno, y determinar la existencia de diferencias en la localización, entre individuos provenientes de los distintos tipos de respuesta al hongo, que pudieran considerarse factores de resistencia.

Los métodos histoquímicos (II.2.5.2.2.4) presentaron reacciones muy visibles de color rojo brillante en el caso del reactivo del ácido nitroso, y verde grisáceo oscuro en el caso del $ClFe_3$. Sin embargo la rápida difusión de los fenoles fuera de las células obstaculizó la exacta determinación de los tejidos que los contenían, a pesar de los intentos realizados a fin de inmovilizarlos.

El método de autofluorescencia resultó más aconsejable para estos estudios ya que al ser posible el montaje de los cortes histológicos en seco, los fenoles no difundieron.

Sobre la base de la fluorescencia exhibida antes y después de exponer los cortes al hidróxido de amonio se distinguieron 4 tipos principales de reacciones a la luz UV.

- 1) Paredes azules que no viraron. Según Harris y Hartley (1976) las paredes que presentan dichas características, que dan una reacción positiva con el test del floroglucinol HCl (II.2.5.3) y no son degradadas por celulasa (II.2.5.2.2.4) estarían lignificadas.
- 2) Paredes azules que viran a azul más brillante o verde: indicaría la presencia de ácidos fenólicos esterificados con las paredes celulares. Si dichas paredes no dan el test del floroglucinol HCl y la fluorescencia desaparece luego de tratamiento con celulasa dichos ácidos estarían unidos a polisacáridos de paredes no lignificadas (Harris y Hartley, *op. cit.*), de lo contrario constituirían unidades de ligamiento entre la lignina y los carbohidratos estructurales (Brown, 1966).
- 3) Contenido celular azul que vira a verde intenso luego de la exposición al amonio. Estas características son propias de los ácidos cafeoilquínicos que como se indicó son los fenoles más abundantes en los tallos de girasol, se acumulan significativamente en las L de los tallos inocuidos tolerantes, y exhiben efecto inhibidor del CM (III.3.4).
- 4) Corpúsculos de fluorescencia amarilla que no vira (naturaleza no identificada).

Fenoles solubles:

En las plantas sanas, los fenoles solubles (detectados a través de la fluorescencia azul que viraba a verde) se observaron únicamente en algunas células de la corteza, independientemente de la edad y zona del tallo (Figuras 53 y 54 b y d; 55).

En las L y SA del estadio I inoculado los fenoles se localizaron en todas las células de la corteza (fig. 55), cambium, floema, parénquima interfascicular (Fig. 56) y parénquima medular adyacente a los haces (fig. 53 a y 57).

En las L y SA de II_T y IV ocuparon el interior de todas las células de la corteza, floema y cambium (Fig. 53 y 54 c).

Por el contrario, en los márgenes de las lesiones de los individuos susceptibles (II_S) no se observaron diferencias respecto al testigo (Fig. 54 a). En las SA de los individuos en los que se acumularon fenoles, la localización fue similar a la de la edad I de lo contrario se asemejaron al testigo. La gran destrucción de los tejidos por la acción fúngica en estos individuos imposibilitó el estudio de otras zonas de la lesión.

Fenoles insolubles:

- A) Paredes lignificadas: Independientemente del estado sanitario y edad del hospedante las paredes de los elementos del xilema primario, secundario, floema primario y casquetes de fibras presentaron todas las características propias de la lignificación es decir fluorescencia azul que no vira test de floroglucinol ClH positivo y resistencia a celulasa (Fig. 56, 58 y 59).
- B) Paredes lignificadas con ácidos fenólicos esterificados: las paredes de los vasos xilemáticos secundarios más jóvenes, es decir más cercanos al cambium presentaron una fluorescencia azul que viró a verde o se intensificó, adicionalmente exhibieron una reacción positiva frente al floroglucinol ClH y resistieron el tratamiento con celulasa.
- Estas características se presentaron en todos los tallos independientemente de la edad y estado sanitario. Podría deberse a un menor grado de lignificación en estas estructuras más jóvenes. Los ácidos fenólicos en estos casos podrían constituir un paso previo en dicho proceso ya que de acuerdo con la hipótesis de El-Basyouni, Neish y Towers (en Brown, 1966) ciertos ésteres insolubles de ácidos hidroxicinámicos serían los precursores reales de la lignina.
- C) Paredes no lignificadas, con ésteres de ácidos fenólicos: en las paredes de ciertas células no lignificadas surgió una fluorescencia postinfeccional. Este evento estuvo restringido a los individuos tolerantes de las edades I, II y IV. Las paredes de las capas externas de la corteza en los tres estadios (Figura 55) y del parénquima interfascicular en el estadio I (Fig. 56) presentaron una fluorescencia azul que viró a verde con amonio pero no

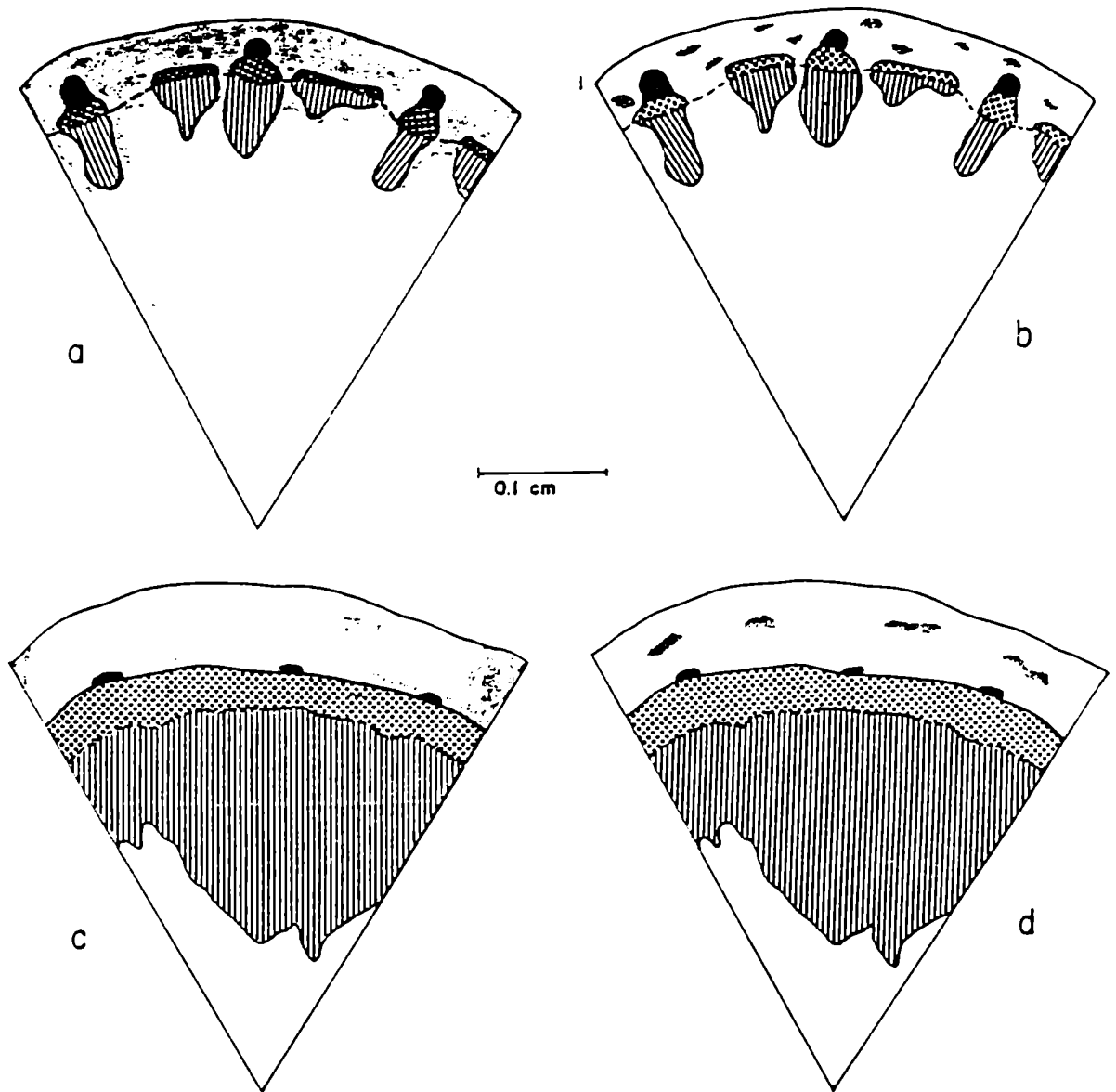
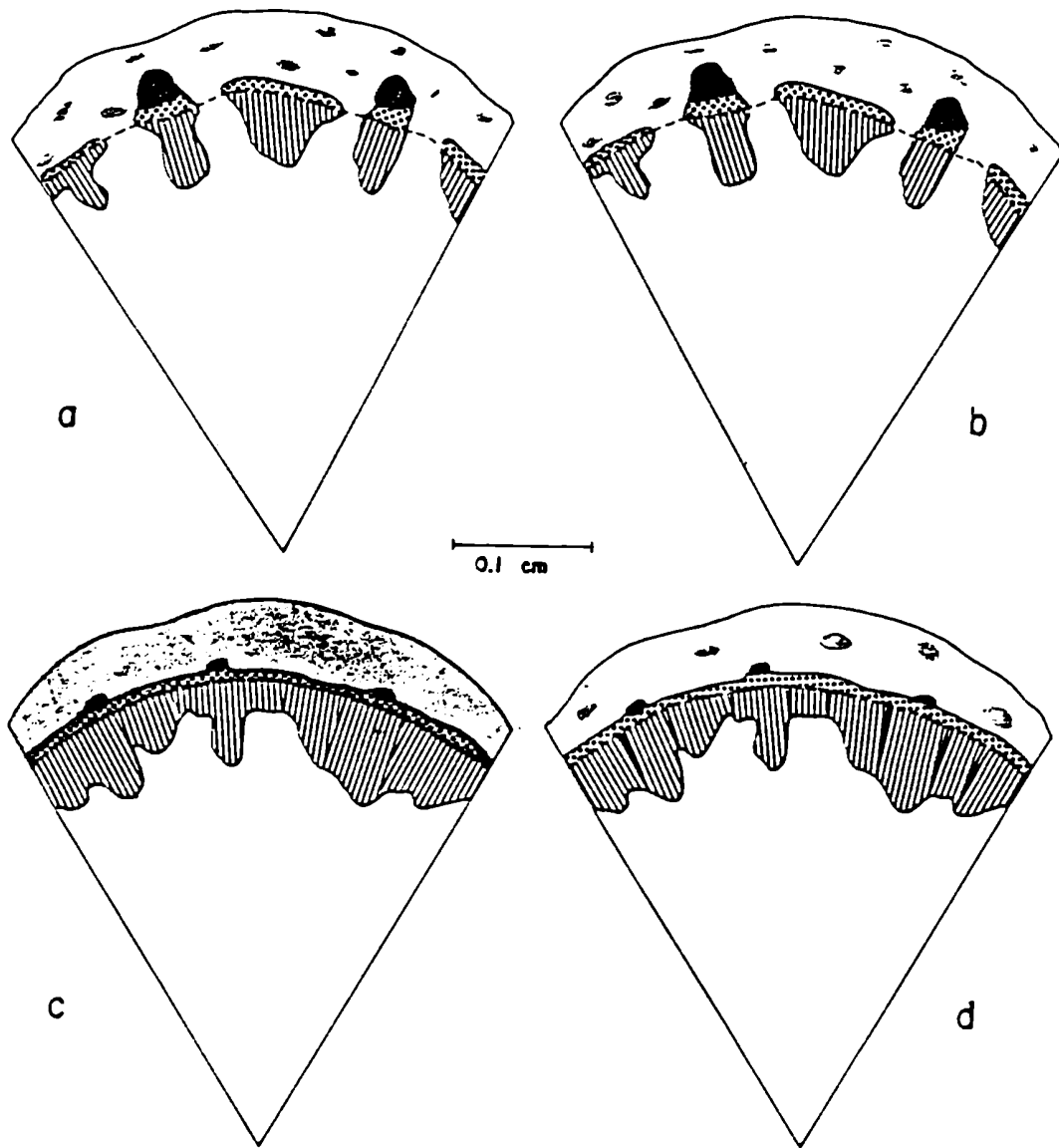


Figura 53: Localización anatómica de los fenoles solubles en los márgenes de lesiones y tejidos similares de a: edad I inoculado; b: edad I testigo; c: edad IV inoculado y d: edad IV testigo. Fenoles: sombreado; fibras: negro; floema: punteado y xilema rayado.



Localización anatómica de los fenoles solubles en los márgenes de las lesiones y tejidos similares de a: lesiones de individuos de edad II susceptibles (II_S); b: II_T testigo en alturas similares a II_S; c: lesiones de individuos de edad II tolerantes (II_T) y d: II_T testigo en alturas similares a II_T.

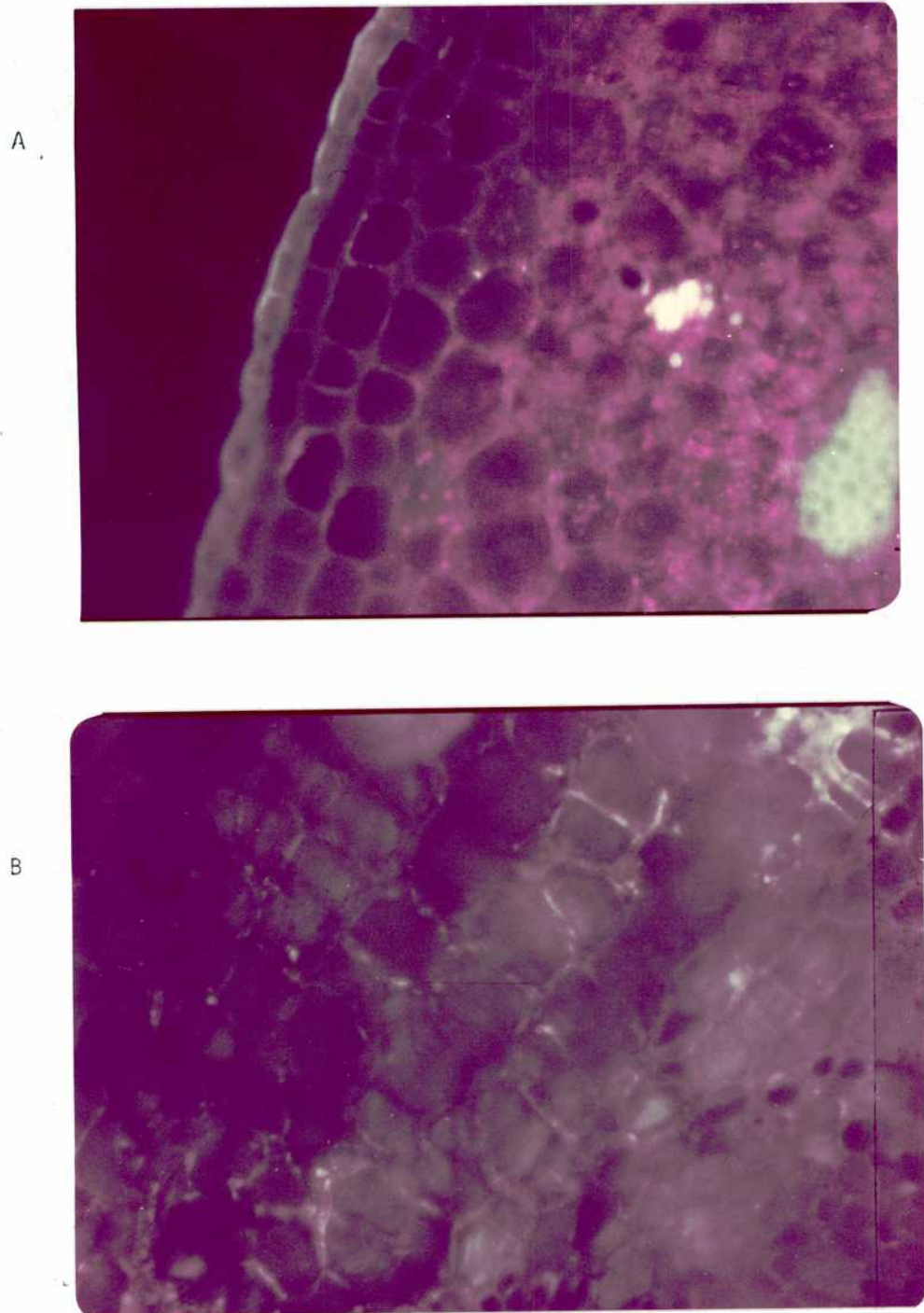
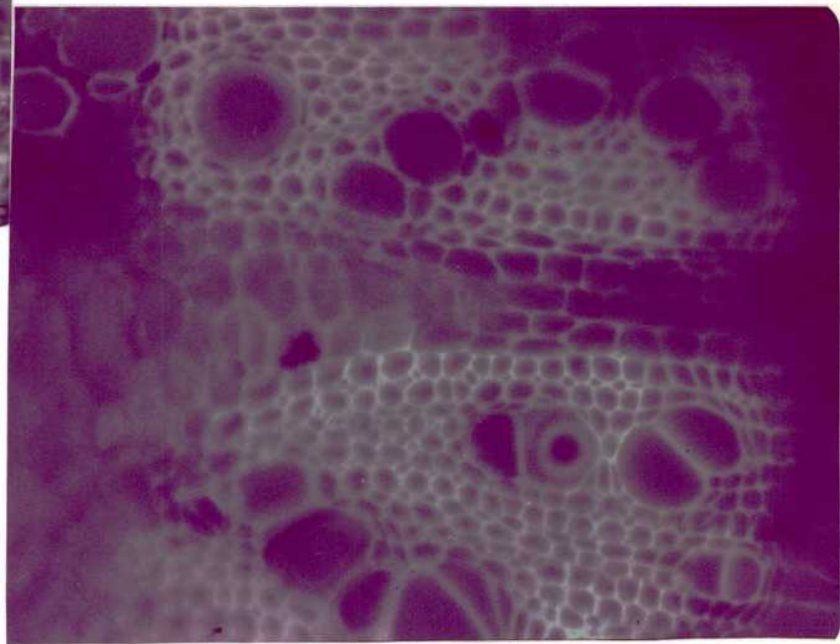
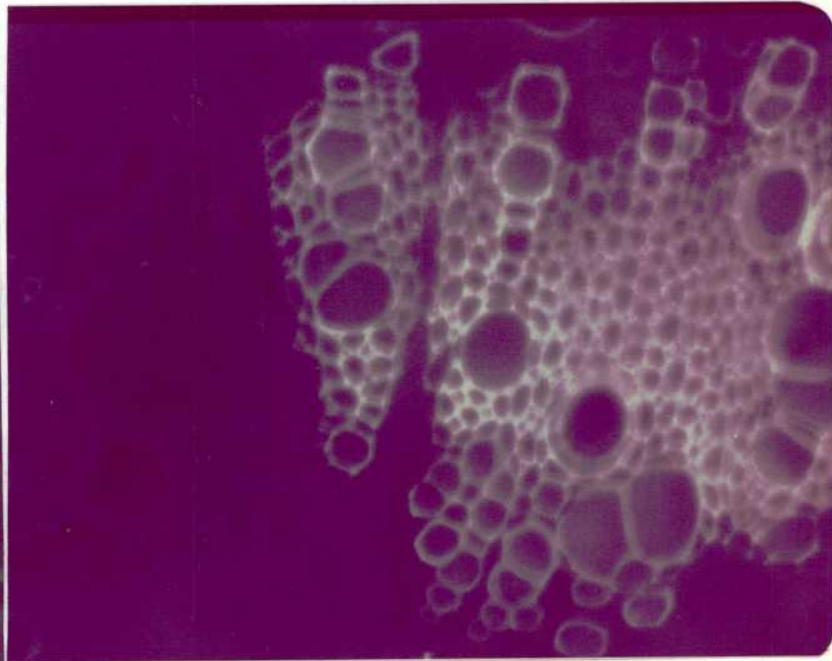
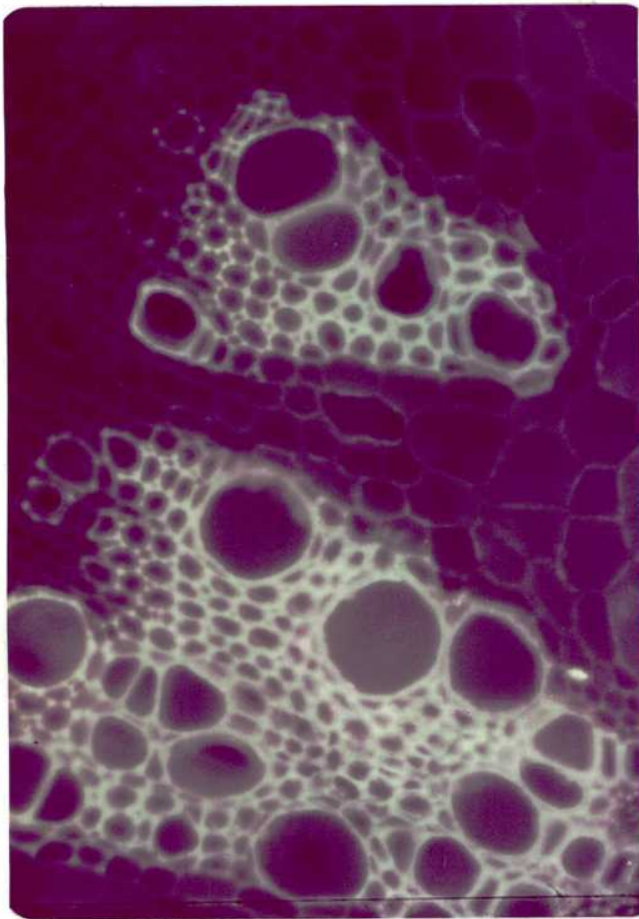


Figura 55: Fenoles en corteza de tallos en estadio vegetativo (I) (tolerante), cortes transversales a 1,5 cm de altura. Observación en microscopio UV (500X). A: tallo sano, observar algunas células con contenido azul (fenoles solubles). B: tallo inoculado, todas las células con contenido azul (fenoles solubles) y las paredes celulares con fluorescencia postinfeccional celeste brillante (impregnación con compuestos fenólicos).

A

C



B

Figura 56: Xilema primario y parénquima interfascicular de tallos en estadio vegetativo (I) (tolerante), cortes transversales a 1,5 cm de altura. Observación en microscopio UV (500X). A: tallo sano: paredes lignificadas de elementos xilemáticos celeste brillante. B: tallo inoculado: fluorescencia postinfeccional celeste de las paredes de las células del parénquima interfascicular (impregnación con comps. fenólicos) y contenido azul postinfeccional en dichas células (fenoles solubles). C: tallo inoculado incubado con célula-sa.

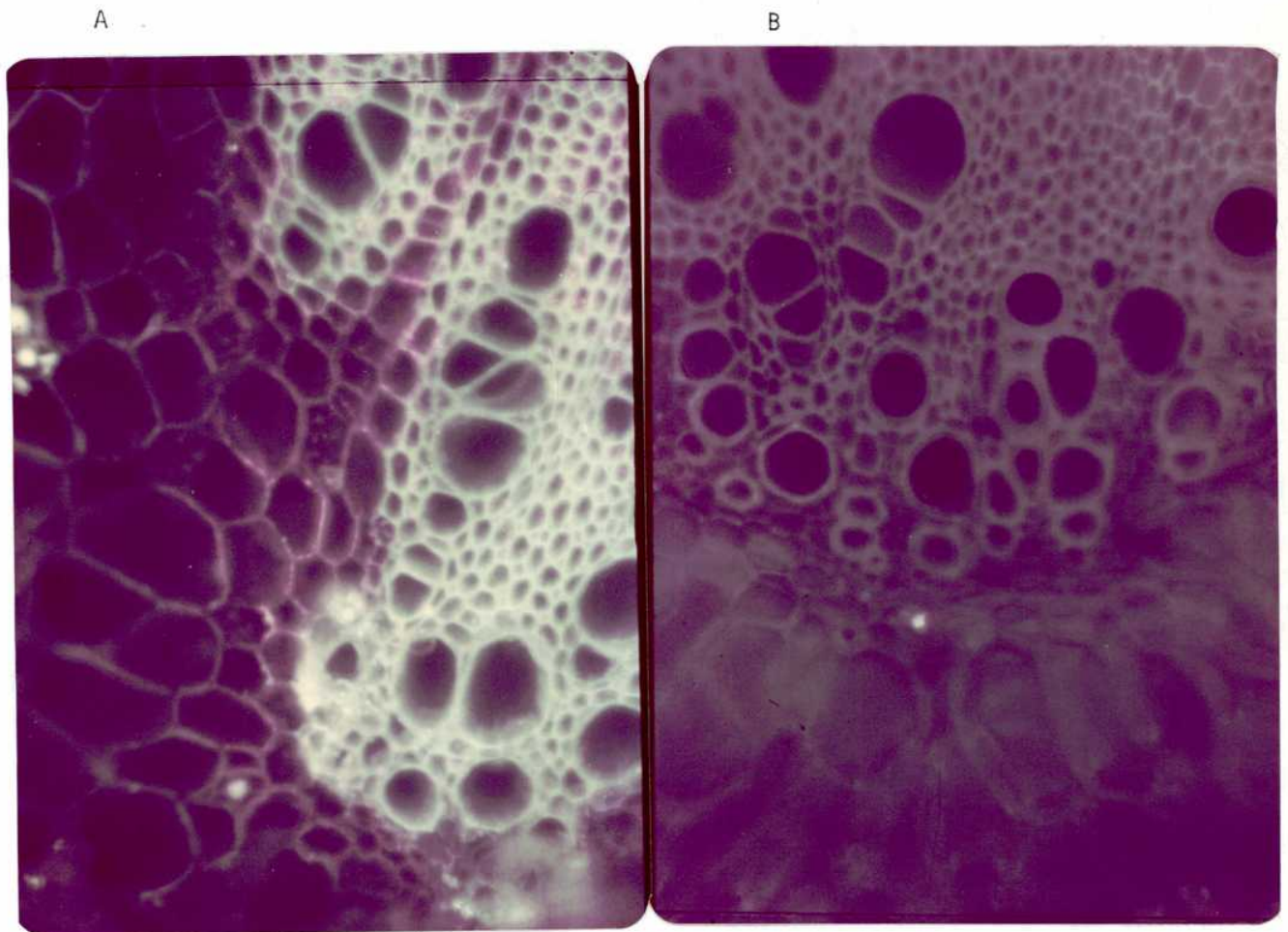
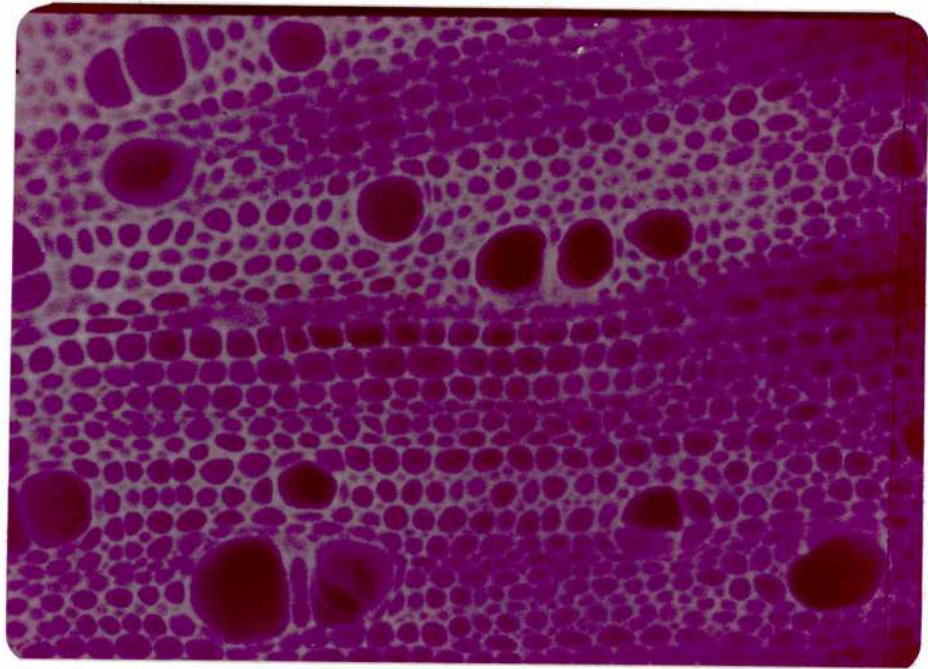


Figura 57: Parénquima medular adyacente a las haces vasculares, en tallos de estadio vegetativo (I) (tolerante). Cortes transversales a 1,5 cm de altura. Observación en microscopio UV (500X). A: tallo sano. B: tallo inoculado. Células parenquimáticas con contenido postinfeccional azul (fenoles solubles).

A



B

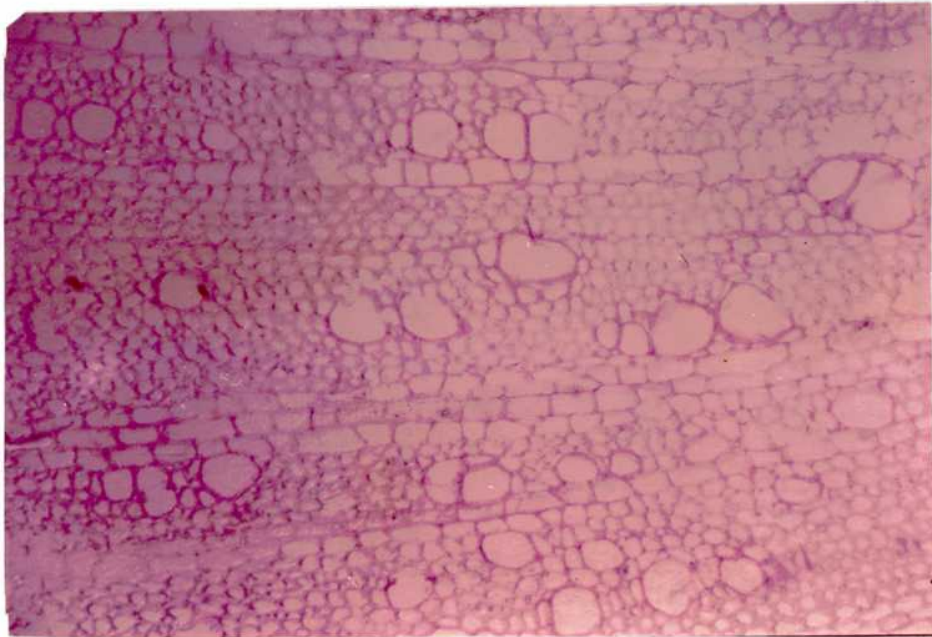


Figura 58: Xilema secundario, en tallos sanos de estado de botón floral abierto (IV). Cortes transversales a 1,5 cm de altura ($\times 500$). A: observación en microscopios UV sin tinción: elementos lignificados, con fluorescencia celeste y B: observación en microscopio óptico con floroglucinol CI H: elementos lignificados de paredes rojo-púrpura.

A



B

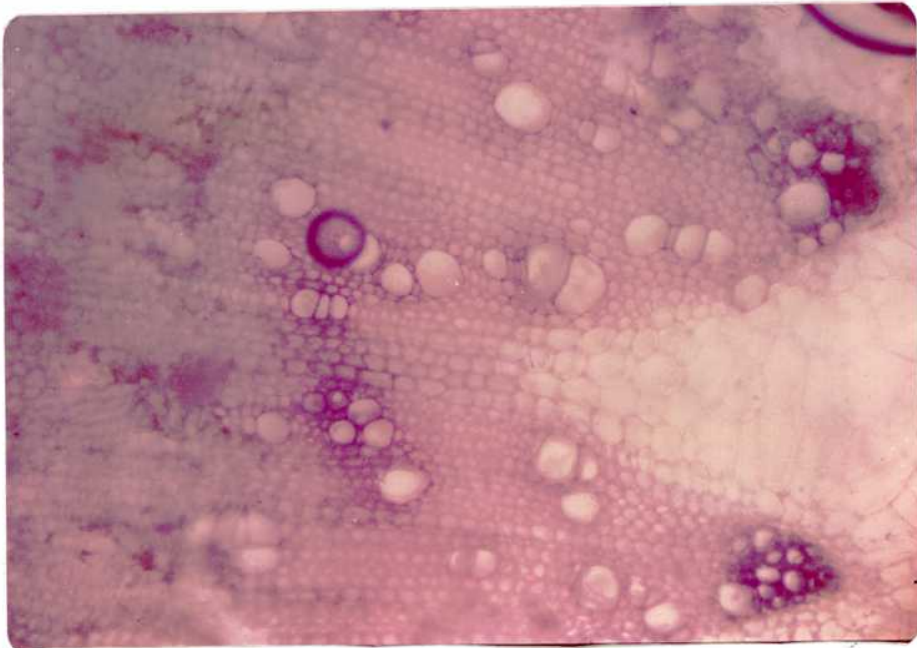


Figura 59: Xilema primario y secundario incipiente en cortes transversales de tallos, a 2 cm de altura. Observación en microscopio óptico test del floroglucinol HCl. A: xilema primario y parénquima interfascicular en tallos de estadio vegetativo (I) (500X); B: xilema secundario incipiente en tallos de estadio de botón floral cerrado (II) (2000X).

dieron una respuesta positiva frente al floroglucinol ClH. Dicha fluorescencia desapareció luego del tratamiento con celulasa o la hidrólisis básica con OHNa 1 M (16 hs a 20°C) (Fig. 56).

Con el propósito de contar con mayores evidencias acerca de la interpretación del punto C) respecto a que la aparición de la fluorescencia postinfeccional en ciertas paredes se deba a una esterificación fenólica restringida a individuos tolerantes se realizó un estudio cromatográfico del producto de la hidrólisis de las paredes del hospedante previa extracción exhaustiva de los fenoles solubles presentes en los tejidos.

Tanto la hidrólisis básica como a través de celulasa (11.2.5.2.2.4.) arrojaron resultados similares. La observación de los cortes luego de la hidrólisis demostró la desaparición de la mencionada fluorescencia (Fig. 56). En los cromatogramas provenientes de los hidrolizados de individuos tolerantes (I y IV) se observaron una o dos manchas fluorescentes las que no estuvieron presentes en los provenientes de plantas testigo, susceptibles, ni en el control de solventes (Fig. 60). Las características de R_f coincidirían con las de los ácidos cafeico y ferúlico para las de la fluorescencia UV antes y después de exposición al amonio indicaron que podría tratarse de los ácidos cafeico y cumárico. Sin embargo sería necesario estudios adicionales como espectros, etc para corroborarlo. No obstante, estudios químicos realizados en otras especies vegetales citan la ocurrencia de los ácidos ferúlico y cumárico (Harris y Hartley, 1976) en todas las gramíneas analizadas y en papa resistente a *P. infestans* (Friend, 1977) y a los ácidos hidroxibenzoico e hidroxici-námicos en plantas inferiores (Friend, 1976). Finalmente, en cuanto a la unión de ésteres fenólicos a paredes lignificadas se ha citado la presencia de los ácidos p-cumárico, ferúlico, vanílico, siríngico y p-hidroxibenzoico (Brown, 1966).

Conclusiones

- La localización periférica de los compuestos fenólicos solubles inhibidores coincidente con las zonas de infección constituye un elemento más a favor de la hipótesis de la relación de los mismos con la tolerancia. Esto explicaría porqué las lesiones en los individuos tolerantes se restringen a las capas más externas de la corteza.

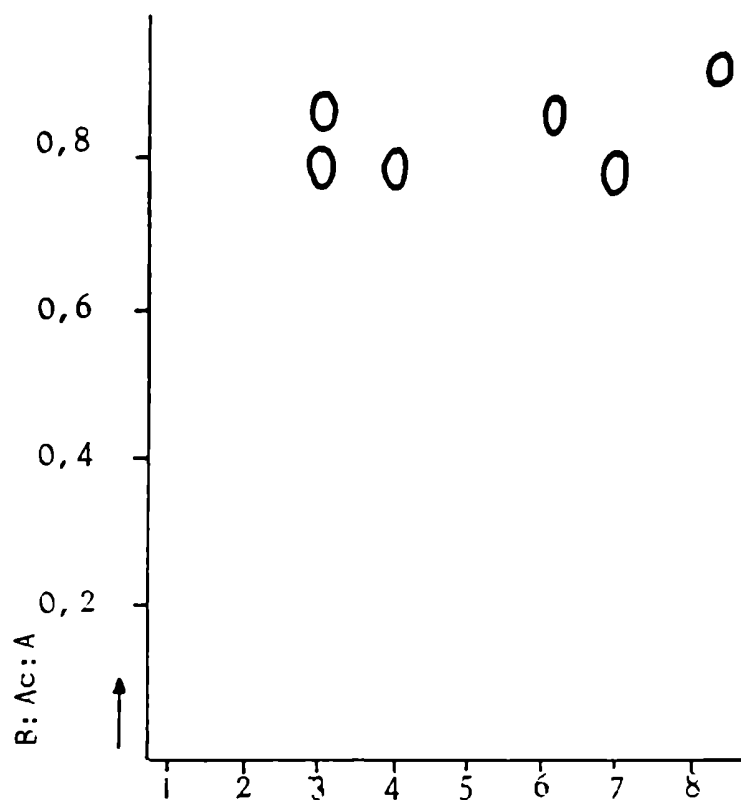


Figura 60: Compuestos fluorescentes productos de la hidrólisis básica de tejidos vegetales de distintas edades extraídos previamente con metanol, sobre cromatografía en papel. 1: testigo de solventes; 2: lesiones de individuos susceptibles (115) 3: lesiones de individuos de estadio IV; 4: lesiones de individuos de estadio I; 5: tejidos similares de testigos en estadio I, 6: ácido ferúlico comercial; 7: ácido cafeico comercial y 8: ácido cumárico comercial.

- No se hallaron diferencias en la localización de los fenoles solubles con la edad. Por lo tanto las diferencias entre edades susceptibles y tolerantes se debería únicamente a causas de tipo cuantitativo y de velocidad de síntesis de los compuestos inhibidores.
- La aparición de una fluorescencia postinfeccional en las paredes de ciertas células de las capas más externas de la corteza y parénquima interfascicular, dada por la esterificación de ác. fenólicos a las mismas, podría constituir una barrera activa de tipo químico o mecánico que dificulte o impida el paso del patógeno hacia el tejido vascular o parénquima medular. Esto sin duda sería un obstáculo para la distribución de la toxina a través del xilema y el acceso del hongo hacia el interior del hospedante.

Ride (1978) describe un cierto número de alteraciones de las paredes celulares que se relacionan con la resistencia a enfermedades parasitarias. Las principales son la deposición de calosa, calcio, suberificación, melanización (deposición de polímeros de fenoles oxidados), lignificación e impregnación de las paredes con ácidos fenólicos. La alteración observada en los tallos tolerantes de girasol estaría incluida dentro de uno de los dos últimos tipos.

Friend (1976) quien se ha dedicado al estudio de la lignificación y formación del material del tipo de la lignina en los tejidos infectados interpreta dichos eventos como barreras activas que pueden tener una función de tipo física o química en la resistencia. Un tipo de barrera física implica la formación de una capa de lignina o material similar que se interpone entre las enzimas del patógeno y los carbohidratos de las paredes imposibilitando el contacto con los sustratos. La hipótesis de la barrera química requiere la alteración del sustrato polisacárido de la pared de forma tal que aunque la enzima tome contacto con este sustrato modificado no sea posible la formación del complejo enzima-sustrato necesario para que se produzca la reacción lítica o hidrolítica.

La lignificación o formación de compuestos del tipo de la lignina como consecuencia de la infección se ha relacionado con la resistencia del trigo frente a numerosas especies de hongos (Ride, 1980), del rábano frente a Peronospora parasitica (Asada et al., 1976), del zapallito frente a Cladosporium cucumerium (en Friend, 1976), de la papa frente a Phytophthora infestans (Friend op. cit.), etc.

III.4. Factores mecánicos en relación con la tolerancia

III.4.1. Introducción

Royle (1976) considera que la colonización fúngica puede verse restringida a áreas discretas debido a la presencia de tejidos que constituyen barreras resistentes a la degradación. Estas generalmente comprenden células suberificadas o lignificadas que pueden variar en número y distribución entre cultivares, órganos de una misma planta, o con la edad del hospedante. En otros casos ciertas barreras mecánicas se forman activamente como consecuencia de la infección (1.3.3.3.6).

La impregnación postinfeccional de ciertas paredes celulares con ácidos fenólicos en los individuos de girasol tolerantes a la podredumbre basal podría de hecho constituir una barrera mecánica de este último tipo mencionado (cfr. III.3.7).

Se buscó conocer la existencia de otros factores adicionales en relación con este tipo de mecanismos que pudieran contribuir a las diferencias en la velocidad del CM en el interior del hospedante, que exhibe el patógeno en los distintos estadios. Este tipo de barreras podría actuar conjuntamente con los compuestos inhibidores descritos en III.3 o previamente, permitiendo el desarrollo de los mecanismos bioquímicos.

Se llevó a cabo un estudio ontogénico de la anatomía del tallo sano. Además se realizaron tests con el reactivo de floroglucinol HCl para detectar los tejidos lignificados y, de acuerdo con la intensidad del color de la reacción, conocer el grado de lignificación de los mismos (II.2.5.3).

El conocimiento del desarrollo del sistema vascular en las porciones del tallo atacado sumado al cálculo de los volúmenes de "tejido cortical" (epidermis, corteza, floema y parénquima interfascicular) (C) y xilemático (X) en cada estadio permitió considerar al órgano en su real dimensión en términos no solo del tipo sino también de la proporción de los tejidos que el patógeno debe penetrar hasta acceder al tejido X y/o a la médula. Se consideró que la accesibilidad de estos últimos tejidos constituye un "punto clave" en la determinación del grado de susceptibilidad de la planta en cuanto a la distribución de las toxinas fúngicas y a la pérdida de la capacidad de sostén del tallo.

III.4.2. Tallo sano

III.4.2.1. Descripción anatómica

Los resultados de los estudios anatómicos concidieron estrechamente con las observaciones de Thoday (1922). El tallo exhibe crecimiento secundario que se inicia en la base y se desarrolla hacia el ápice, a medida que los tallos van adquiriendo una mayor edad. De esta forma, individuos de distintas edades presentan a una determinada altura tallos en diferentes estados de desarrollo. Al nivel del límite superior de la lesión (l.s) los tallos en edad I; exhiben crecimiento primario (l.s: 1). En los tallos de la edad II, el grupo S mostró también crecimiento primario (l.s. 4 cm) mientras que el grupo T presentó un crecimiento secundario incipiente (l.s. 2 cm). Todos los tallos de edad IV tenían crecimiento secundario (l.s. 1.8 cm) (Fig. 53 y 54).

Crecimiento primario: el tallo está constituido por una epidermis uniestratificada; una corteza parenquimática, cuyas dos capas de células más externas son colenquimatosas con engrosamientos angulares (no siempre presente); el sistema vascular; y la médula de parénquima esponjoso.

El sistema vascular está constituido por un anillo de haces vasculares separados por un parénquima interfascicular delgado. Cada haz está formado por floema primario hacia afuera y xilema primario hacia adentro. Entre ambos tejidos se localiza el cambium fascicular el que se continúa con el interfascicular. Hacia el exterior de cada haz se observa un casquete de fibras (Fig. 53).

Crecimiento secundario incipiente: Con el crecimiento en diámetro del tallo la médula se agranda y los haces se separan mucho entre sí. Tanto el cambium fascicular como el interfascicular comienzan su actividad, pero no lo hacen en forma uniforme. Por eso, en esta etapa del desarrollo se observa, en cortes transversales, porciones "triangulares" de xilema secundario en las zonas interfasciculares. Los haces aún son distinguibles como tales pero en ellos también se ha incorporado xilema y floema secundario (Fig. 54). A este nivel ya no se distingue el parénquima interfascicular y el sistema vascular en su conjunto constituye un anillo continuo pero de grosor irregular.

Crecimiento secundario: La actividad cambial continúa hasta el logro de un anillo completo más o menos uniforme de xilema y floema secundarios (Fig. 53).

El xilema secundario está formado por fibras, grandes vasos con puntuaciones, y radios medulares (Thoday, 1922).

III.4.2.2. Proporción de los distintos tejidos en cada edad

En la zona de inoculación el crecimiento es secundario, independientemente de la edad del hospedante. Considerando una sección transversal a esa altura, la superficie ocupada por el tejido C no varió con la edad en tanto que la del anillo xilemático fue menor en el estadio más joven ($P: 0,05$) que en el adulto y presentó valores intermedios en los tallos de edad II (Tabla XXXXVI).

Si se regresa a la Fig. 17 (III.1.4.2) se recordará que las diferencias en la extensión de las lesiones se hacen significativas al 4º día cuando prácticamente se detiene el crecimiento en las edades tolerantes en tanto que se incrementan bruscamente en el estadio II₅. En los estadios tolerantes, la longitud promedio de las lesiones se estabiliza en valores entre el primer y segundo centímetro de altura a partir del punto de inoculación.

Al comparar los volúmenes de C y X comprendidos entre la zona de inoculación y el centímetro de altura en las distintas edades, se encontraron diferencias entre tejidos y entre edades ($P: 0,05$). Tanto el volumen de tejido C como el xilemático se incrementan con la edad del hospedante. Nuevamente no se hallaron diferencias significativas entre los estadios más adultos respecto al X, pero sí a la C que fue mayor en II (Tabla XXXXVIII). La relación C/X se mantuvo constante en I y II (1,6) pero disminuyó y se hizo igual a 1 en el estadio IV.

Al alcanzar el centímetro de altura, el hongo no solo hallará diferencias a nivel de la distribución del tejido xilemático (cfr. Figuras 53 y 54) sino también en la distancia que debe atravesar para acceder a la médula.

La superficie de tejido cortical es menor en la edad más joven; le sigue la edad adulta y por último la edad II (Tabla XXXXVII). Con referencia al X su superficie es menor y con distribución interrumpida en la edad I y semejante en las edades II y IV (Tabla XXXXVII).

Tabla XXXXVI: Superficies ocupadas por tejido "cortical" (C) y xilemático (X) en la zona de inoculación, de acuerdo con la edad del hospedante (cm²).

	I	Estadios II	IV
C	0,22 ^{ab}	0,35 ^b	0,30 ^b
X	0,135 ^a	0,26 ^{ab}	0,31 ^b

Los valores son promedio de tres repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas al 1%. Las comparaciones son válidas dentro y entre filas y columnas. I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

Tabla XXXXVII: Superficies ocupadas por tejido "cortical" (C) y xilemático (X) a 1 cm de altura respecto a la zona de inoculación, de acuerdo con la edad del hospedante (cm²).

	I	Estadios II	IV
C	0,17 ^a	0,35 ^d	0,27 ^c
X	0,09 ^b	0,22 ^c	0,23 ^c

Los valores son promedio de tres repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas al 1%. Las comparaciones son válidas dentro y entre filas y columnas. I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

Tabla XXXVIII: Volúmenes de tejido "cortical" (C) y xilemático (X) comprendidos entre la zona de inoculación y el centímetro de altura (cm³), en tallos sanos de distintas edades.

	I	Estadio II	IV
C	0,19 ^a	0,32 ^b	0,28 ^{bc}
X	0,11 ^d	0,25 ^c	0,27 ^{bc}

Los valores son promedio de tres repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas al 1%. Las comparaciones son válidas dentro y entre filas y columnas. I: vegetativo; II: botón floral cerrado y IV: botón floral abierto.

Tabla XXXIX: Volúmenes de tejido "cortical" (C) y xilemático (X) en distintas alturas del tallo sano, de distintas edades.(cm³).

Altura		I	Estadio II
0-1 cm	C	0,19 ^b	0,32 ^a
	X	0,11 ^c	0,25 ^d
1-2 cm			0,34 ^a
			0,20 ^b
2-3 cm	C		0,34 ^a
	X		0,17 ^b

Los valores son promedio de tres repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas al 1%. Las comparaciones son válidas dentro, entre filas y columnas. I: vegetativo y II: botón floral cerrado. -: no realizado.

III.4.2.3. Lignificación de los tejidos

La presencia de la lignina y su formación en las paredes celulares ha sido estudiada frecuentemente a través del empleo de reacciones de color específicas. Por ejemplo, la formación de un color rojo-púrpura luego del tratamiento con el reactivo del floroglucinol-HCl se ha empleado para detectar lignina en numerosas especies vegetales (Higuchi, 1981). La típica coloración se debe a la presencia en estos polímeros de moléculas de aldehídos p-hidroxicinámicos tales como los aldehídos coniferílicos.

A la altura del margen superior de las lesiones en los tallos de edad I y II_S se distinguió una reacción positiva en las paredes de los elementos del xilema y floema primarios y casquetes de fibras. En los tallos de edad II_T, en las del xilema primario, secundario, floema primario y casquetes de fibras; en este caso el anillo de células lignificadas es casi continuo (Fig. 54). En el estadio IV, a la altura del margen superior de la lesión todos los elementos mencionados para II_T reaccionaron positivamente. A medida que los elementos se acercaron al cambium la coloración se hizo más tenue. Esto puede deberse a que dichos elementos son más nuevos y por lo tanto menos lignificados (Higuchi, 1981).

En las zonas basales (de inoculación) reaccionaron positivamente todos los elementos del xilema primario, secundario, floema primario y casquetes de fibras, independientemente de la edad del tallo. En el estadio IV sin embargo la coloración resultó más intensa lo que denotaría una mayor lignificación de los tejidos.

El estudio de los tallos con microscopio de fluorescencia (cfr. III.3.7) permitió confirmar todo lo antedicho. La lignina fluoresce bajo la luz UV emitiendo un color celeste brillante que no vira ante la exposición a los vapores de amonio. Sin embargo como se mencionó en III.3.7 las paredes de ciertos vasos en todos los estadios (generalmente los próximos al cambium) viraron a verde al ser expuestos a amonio.

III.4.3. Tallo enfermo

Estadios tolerantes: no se observó modificaciones a nivel del grosor de las paredes, formación de geles, tilosis o aposición de carbohidratos. Las lesiones estuvieron restringidas a las zonas corticales, y no afectaron aparentemente el

tejido vascular. Las células atacadas se mostraron comprimidas, perdieron su individualidad y quedaron reducidas a paredes celulares de color castaño rojizo oscuro debido a su impregnación con melaninas (polímeros fenólicos oxidados). El estudio de los márgenes de la lesión al microscopio UV permitió detectar la aparición de ésteres de ácidos fenólicos en las paredes de las capas más externas de la corteza y del parénquima interfascicular de la edad I y de la corteza de las edades II_T y IV (cfr. III.3.7) que no reaccionaron positivamente con floroglucinol CIH. Este tipo de estudio bajo luz UV así como el tratamiento de los cortes histológicos con celulasa seguido de nueva observación al UV resultó fundamental para confirmar en los tallos enfermos lo descrito con el test histoquímico, ya que ciertas ligninas sintetizadas postinfeccionalmente pueden no reaccionar con el floroglucinol CIH debido a variaciones en su composición química (Bell, 1981; Asada et al., 1976).

Estadio susceptible: las lesiones acuosas y profundas alcanzaron la médula. Los tejidos estaban tan altamente destruidos al 5º día que fue imposible individualizar las células del hospedante. El estudio de los márgenes de las lesiones indicó que en estos no aparece la fluorescencia postinfeccional presente en los tallos primarios de la edad I. Tampoco se observó la formación de melaninas. Sin embargo, al analizar zonas del tallo separadas en ocasiones varios centímetros de los márgenes de las lesiones se encontró que los haces correspondientes al lado del tallo más afectado o de todo el tallo (si el ataque era muy severo) estaban completamente oscurecidos.

III.4.4. Conclusiones

- Desde el punto de vista anatómico, el mayor volumen de tejido lignificado y su distribución continua en las zonas de crecimiento del hongo contribuirían con la tolerancia en los estadios más adultos (II y IV). S. sclerotiorum es un patógeno que se caracteriza por poseer un sistema enzimático muy completo pero hasta el momento no se ha demostrado que produzca ligninasas (Lumsden, 1979). De hecho en numerosas interacciones hospedante-patógeno la presencia de tejidos lignificados y la producción, velocidad de síntesis y extensión de la lignificación postinfeccional se relaciona con la resistencia (Bell, 1981; Friend, 1976;

Ride, 1978 y 1980; Brown, 1966).

Con referencia a este aspecto, el estadio I presentaría una mayor debilidad, ya que tanto desde el punto de vista del volumen de los elementos lignificados como de su distribución se haya en desventaja respecto a los otros estadios. Sin embargo, puntos vulnerables no lignificados que constituirían "puertas de fácil acceso" hacia la médula como los espacios interfasciculares estarían protegidos por la presencia de ácidos fenólicos esterificados en las paredes parenquimáticas (III.3.7 y III.4).

IV. DISCUSION GENERAL

Habiéndose discutido previamente y en detalle los resultados obtenidos en cada punto de este trabajo se ofrece, aquí, una suscita integración de los aspectos más sobresalientes.

La alta inespecificidad de los mecanismos ofensivos de S. sclerotiorum lleva indudablemente a la consideración que solo a través de la combinación de más de un mecanismo, desarrollados en la magnitud, lugar y momento adecuados, es posible alcanzar la tolerancia.

¿Como explicar que los tallos jóvenes en estadio vegetativo (I), con un menor volumen cortical y xilemático, el que se hace discontinuo a un centímetro de altura a partir del punto de inoculación, posean una tolerancia semejante a la de los tallos más gruesos y lignificados del estadio IV en los que el xilema constituye una barrera continua que impide el avance del patógeno hacia la médula? (Figura 61) (III.4.).

A medida que el hongo penetra los tejidos corticales en el Estadio I, las sustancias inhibitoras alcanzan concentraciones mucho mayores que las CI 100 determinadas in vitro (Figura 61) (III.3). El avance se vería también restringido por la melanización o impregnación fenólica de las paredes celulares, lo que les conferiría una mayor resistencia frente a las enzimas fúngicas (III.3.7.). La menor concentración de compuestos fenólicos inhibidores en el estadio IV podría compensarse por el mayor espesor del parénquima cortical que el hongo debe atravesar para alcanzar el xilema (III.4 y Tabla XXXVIII), y de la eventual acción en este estadio de compuestos no fenólicos (efecto postinfeccional de extractos clorofórmicos) (III.2.4.2.2.).

Los factores mecánicos tales como la presencia de elementos lignificados (preinfeccional) melanizados, o de paredes impregnadas con ácidos fenólicos (postinfeccionales) (Figura 62) serían por sí solos ineficaces para un completo control del patógeno, pero actuarían retardando su avance y posibilitando así el desencadenamiento de los factores bioquímicos de la defensa.

Dentro del estadio II (máxima susceptibilidad) fue posible distinguir individuos que se importaron básicamente igual que los de las edades tolerantes (II_T). En ellos de algún modo persiste la capacidad de sintetizar fenoles por encima de las concentraciones inhibitorias (¿diferencias genotípicas que

se expresan en este estadio?. Por el contrario, al alcanzar aproximadamente el 4º día de la inoculación, un grupo de individuos dentro del estadio II (II_S) se diferencia del resto, presentando síntomas que denotan una alta susceptibilidad. ¿Qué ocurre con estos individuos al 4º día?. Hasta ese momento no había indicios que indicaran un crecimiento fúngico "explosivo" a partir de ese momento. Si regresamos a las figuras 17 y 29 se comprobará que ese día el crecimiento del hongo en el tallo sobrepasa los dos cm de altura, es decir alcanza las zonas en las que el tallo exhibe crecimiento prácticamente primario (III.4), y en las que el volumen de xilema es menor (Tabla XXXIX). En consecuencia, el patógeno arriba a zonas en las que se reduce la resistencia de tipo mecánico (Figura 61). Como se mencionó, en estos individuos no se observaron paredes celulares impregnadas con ácidos fenólicos, y el menor pH del jugo celular de los tallos favorecería el efecto inhibitor del ácido oxálico sobre la actividad de las polifenoloxidasas (Marciano et al., 1983), lo que reduciría la melanización (Figura 62). Este hecho se manifestó a través de las lesiones claras, típicas de los individuos susceptibles (III.1). A esta evidente debilidad se sumaría la menor síntesis de fenoles, o el cese de la misma (III.3.3.1.1.2), con lo que el hongo tampoco hallaría barreras del tipo bioquímico (Figura 62). Más aún, el mayor volumen de tejido parenquimático de la corteza, al no acumular fenoles, podría constituir un factor predisponente, ya que constituye una fuente nutritiva fácilmente degradable. Esto permitiría un aumento en la velocidad del crecimiento micelial, y de la masa fúngica, con la consecuente mayor producción de ácido oxálico (mayor marchitez) y actividad enzimática. Además, la llegada del hongo al sistema vascular favorecería la marchitez provocaría fallas en la traslocación de nutrientes debido al taponamiento de los distintos elementos, y permitiría la distribución de la toxina sistémicamente vía xilema. Finalmente, la destrucción de la médula provocaría un debilitamiento del tallo, y el eventual vuelco de la planta.

El conocimiento de los distintos factores, que se relacionan con la tolerancia puestos en evidencia a través de este estudio, aportan criterios para la búsqueda de la resistencia genética a esta enfermedad. Por ello, deberá corroborarse la existencia de correlación entre los grados de susceptibilidad

que presentan distintos genotipos y el contenido pre y postinfeccional del ácido isoclorogénico y de los fenoles totales en los tallos. En caso de existir correlaciones positivas significativas, sería interesante seleccionar aquellos individuos que posean contenidos preinfeccionales más altos de dichos compuestos, o sean capaces de acumularlos más rápidamente. Sería conveniente combinar la presencia del mecanismo bioquímico con la de tallos más lignificados, y follaje más resistente al ácido oxálico. Asimismo, la confirmación de la heredabilidad del carácter "hipocotile tolerante" en las líneas estudiadas, el estudio de los mecanismos de su herencia y su eventual complementación con otros caracteres como hipocótilos más largos y de capa externa más lignificada podrían constituir elementos de importancia relevantes para la selección de la resistencia genética a esta enfermedad. Además, estos logros deberían ser acompañados con técnicas de manejo del cultivo que eviten el acercamiento del inóculo a los tejidos más susceptibles del tallo (profundidad de siembra, aporque, etc.).

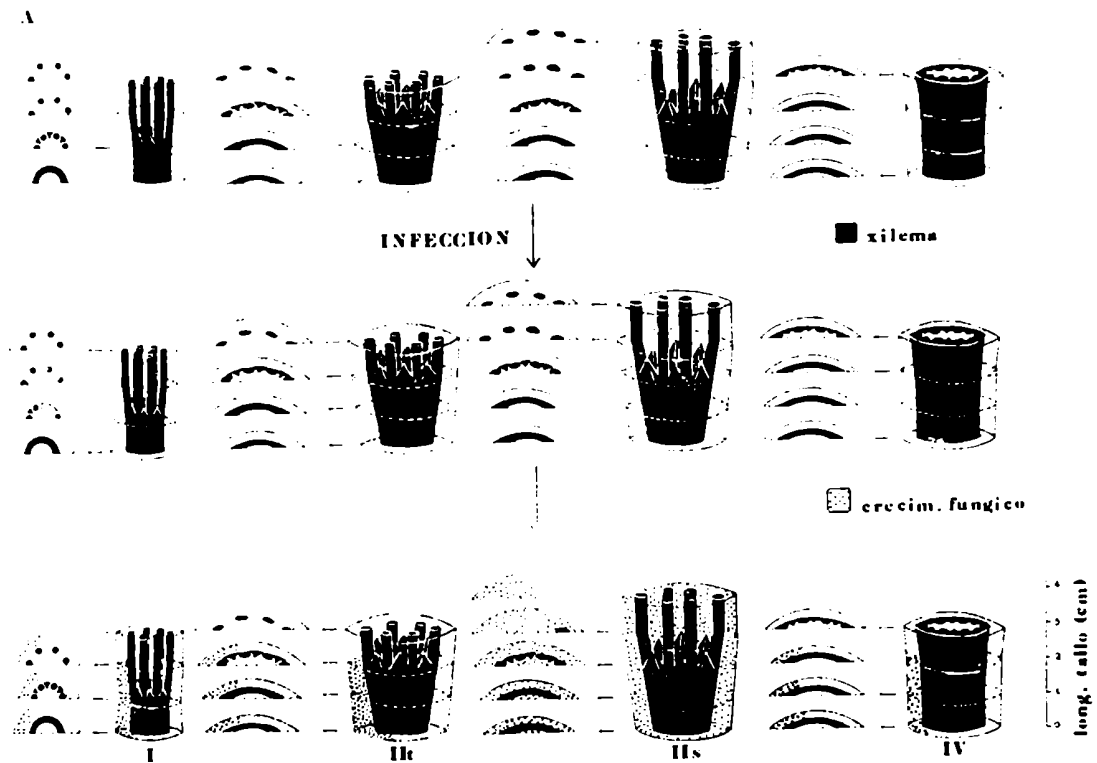


Figura 61: Relación entre los factores mecánicos preinfeccionales y el desencadenamiento de la defensa postinfeccional, según la edad del hospedante. I: vegetativo; IIb: indiv. susceptibles de botón floral cerrado, IIc: indiv. tolerantes de botón floral cerrado; IV: botón floral abierto. A: plantas sanas; B: desencadenamiento de la defensa postinfeccional y C: limitación del crecim. fúngico.

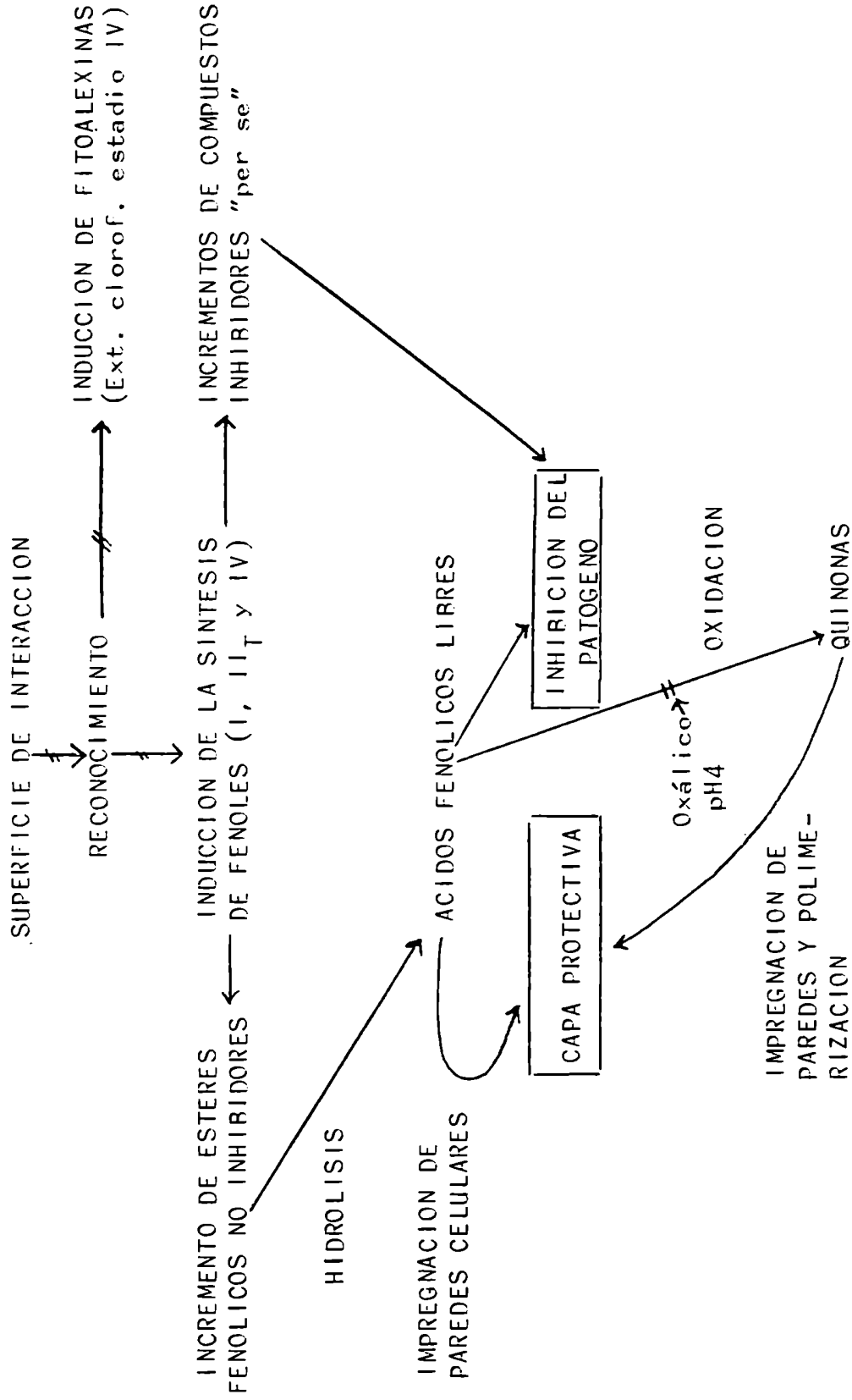


Figura 62: Esquema hipotético de los mecanismos postinfeccionales de defensa en girasol frente a la podredumbre basal. = ausentes o desarrollados ineficazmente en los individuos susceptibles.

V. CONCLUSIONES FINALES

- Existirían diferencias genotípicas para la susceptibilidad, dentro de la línea estudiada, que se manifiestan en mayor medida en el estadio de botón floral cerrado (II) (III.1.4).
- La susceptibilidad se incrementa al disminuir las horas de luz en las que se cultivan las plantas (III.1.4.1. y III.1.4.2).
- La susceptibilidad depende, en la línea estudiada, de la zona de inoculación. El hipocótilo posee una mayor resistencia que el epicótilo. Este carácter se perdería o enmascararía en el híbrido (III.1.3).
- No existen barreras a la penetración, al menos cuando la inoculación se efectúa en el epicótilo (III.1.4).
- La susceptibilidad se asocia de un modo altamente significativo ($P:0,01$) con las siguientes características: lesiones húmedas, claras, de bordes difusos, que rodean todo el tallo, y son más largas que las de los tallos tolerantes tallos huecos y 100% de marchitez foliar (III.1).
- La tolerancia posee los atributos contrarios: lesiones oscuras, secas, superficiales, limitadas y pequeñas; tallos firmes; ausencia de marchitez (III.1).
- Con respecto al estado nutricional del hospedante como predisponente, un menor tenor de azúcares se relacionó con una mayor susceptibilidad; no se encontró relación entre el contenido total de calcio, o aminoácidos libres y la tolerancia/susceptibilidad (III.2.2. y III.2.3.).
- Las diferencias en la susceptibilidad se relacionan con diferencias en la velocidad del crecimiento fúngico en el interior del hospedante. Esto implica la existencia de diferencias en las barreras al desarrollo. Las diferencias entre los grupos tolerante y susceptible dentro del estadio II se hacen visibles al 4º día; antes no es posible distinguir subpoblaciones (III.1.4).
- Se detectaron mecanismos de defensa tanto de naturaleza bioquímica como mecánica en relación con las diferencias en susceptibilidad (Figuras 61 y 62):

Mecanismos bioquímicos

- a. Debido a la infección se produce una alteración general del metabolismo fenólico cualitativamente similar en los distintos estadios. Como consecuencia de ello se acumulan compuestos preexistentes en los tallos sanos, y aparecen otros nuevos.
- b. La tolerancia está relacionada con la acumulación postinfeccional de los compuestos fenólicos. Este fenómeno ocurre tanto en los estadios tolerantes (III.3.3.1.1); en grupos de individuos tolerantes dentro de un estadio susceptible (III.3.3.1.2.1), y en tejidos tolerantes de hospedantes en estadio de máxima susceptibilidad (III.3.3.1.2.2). Por el contrario, la susceptibilidad se caracteriza por una ausencia de acumulación, o una acumulación significativamente menor que la producida en los hospedantes tolerantes. Esto podría deberse a la no inducción de la acumulación, al cese de la misma, o a la acción de un bloqueante de la síntesis de fenoles (III.3.3.1.2.2).
- c. La mayor proporción de fenoles está constituida por ésteres de los ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico y vainílico.
- d. El fenol más abundante en los tallos sanos y que se acumula en mayor proporción fue el ácido isoclorogénico. Dicho compuesto posee efecto inhibitor sobre el crecimiento micelial y alcanza umbrales tóxicos en los tallos tolerantes, pero no en los susceptibles (III.3.4).
- e. El ácido isoclorogénico, determinado como el principal componente de la defensa, fue el fenol más abundante en plantas crecidas a campo y en cámara bioclimática. Esto también ocurre en la especie H. tuberosus, tolerante a la enfermedad (III.3.3.2).
- f. El producto de hidrólisis de los ésteres fenólicos no inhibidores per se (ácidos fenólicos libres) tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento micelial. Las concentraciones mínimas inhibitorias varían con el compuesto en cuestión (III.3.5). La presencia de hidrolasas que llevaran a estos ésteres a sus formas activas, podría constituir un mecanismo de defensa adicional.

- g. Existirían otros compuestos tóxicos de naturaleza desconocida, extraíbles con cloroformo, presentes en el estadio IV. El efecto inhibitor del extracto clorofórmico se incrementa luego de la infección (III.2.4.2.2).

Barreras mecánicas

Preinfeccionales: el mayor volumen de elementos lignificados, y su distribución continua en las zonas de crecimiento fúngico podrían constituir barreras a la penetración, en los estadios II_T y IV (Figura 61). (III.4).

- ii. Postinfeccionales: la melanización, e impregnación con ácidos fenólicos de las paredes no lignificadas que se produce solo en individuos tolerantes, conferirían a las paredes celulares una cierta resistencia frente a la degradación enzimática (III.3.7 y III.4).

VI. RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo de tesis ha sido el estudio de los mecanismos de defensa del girasol frente a la podredumbre basal causada por el hongo Sclerotinia sclerotiorum.

El sistema experimental estuvo constituido por distintos estadios del ciclo de vida del hospedante que exhiben diferencias en su susceptibilidad al ser inoculadas con el hongo. La determinación de dicho sistema implicó la realización de curvas de susceptibilidad en función de la edad bajo dos condiciones lumínicas: 12 y 16 horas de luz diaria. Las edades estudiadas fueron: estadio vegetativo (I); botón floral cerrado (II) y botón floral abierto (IV).

El estudio se llevó a cabo a través del desarrollo de dos líneas principales de trabajo: un estudio del estado nutricional del hospedante previo a su inoculación, el análisis de mecanismos de defensa bioquímicos y mecánicos pre y postinfeccionales.

La primera incluyó un análisis global de ciertos factores nutricionales que podían gravitar tanto como factores predisponentes o de resistencia: contenido de azúcares totales, de aminoácidos libres y de calcio en las zonas basales de tallos sanos de diversas edades.

La segunda se inició con estudios preliminares acerca del efecto de diversos extractos de tallos sanos e inoculados de girasol sobre el crecimiento micelial (CM) y la formación de esclerocios in vitro. Ciertas evidencias sugirieron la relación de los compuestos fenólicos con los efectos inhibidores detectados. Esto llevó a la decisión de profundizar en el papel de estos compuestos en la defensa. Para ello se realizaron estudios cuali y cuantitativos de los fenoles en tallos sanos e inoculados de las diversas edades. Se aisló, identificó y cuantificó el compuesto de mayor actividad antifúngica. Se determinó la concentración necesaria para producir una inhibición del 50% in vitro (CI 50). Como complemento se estudió la localización anatómica por medio de métodos histoquímicos y de autofluorescencia, de los fenoles en cortes transversales de tallos, a fin de conocer si esta coincidía con las zonas de infección.

El análisis de los mecanismos mecánicos consistió en un estudio de la anatomía del tallo sano según la edad del hospedante al inocular. Esto permitió conocer el estado de diferenciación del sistema vascular en cada estadio.

Mediante reactivos histoquímicos se tuvo una idea de la proporción de los elementos lignificados e intensidad de la lignificación. El cálculo de los volúmenes de los distintos tejidos según la edad permitió elaborar una hipótesis acerca de la presencia y cantidad relativa de los mismos como factor de tolerancia o susceptibilidad.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que existen diferencias genotípicas para la susceptibilidad las que exhiben su máxima expresión en el estadio de botón floral cerrado (II). Se corroboró que dicha expresión a su vez aumenta al disminuir la cantidad de horas de luz bajo la que crecen las plantas.

Por ello, las diferencias en susceptibilidad se deberían al menos a los dos tipos de mecanismos: bioquímico y mecánico. Dentro del primero se destacó la acumulación del ác. isoclorogénico por encima de umbrales inhibitorios en los estadios tolerantes o individuos tolerantes dentro del estadio de máxima susceptibilidad. Asimismo se acumularon en los tolerantes ésteres fenólicos no inhibidores per se, pero cuyas agliconas provocaron efectos tóxicos sobre el CM. La localización periférica de los fenoles coincidente, con las zonas de infección constituye una evidencia más a favor de la relación de estos compuestos con la tolerancia.

Con respecto a los factores mecánicos, la presencia de un anillo continuo de elementos lignificados así como un mayor volumen de los mismos, se considera un elemento complementario para retardar el avance fúngico en los estadios más adultos. Sumado a este mecanismo de naturaleza preinfeccional, la impregnación de ciertas paredes celulares con ésteres de ácidos fenólicos como consecuencia de la infección constituiría un factor de tolerancia adicional al dificultar la degradación de las paredes del hospedante.

Los mecanismos bioquímicos incluirían compuestos de otras naturalezas que no han sido estudiados (efecto inhibitor de extractos clorofórmicos en tallos inoculados de edad IV).

El ácido isoclorogénico resultó el compuesto fenólico más abundante en girasoles tolerantes cultivados a campo y en tallos inoculados de H. tuberosus (especie tolerante a S. sclerotiorum).

Ninguno de los componentes de defensa sería por sí solo responsable de la tolerancia, sino que esta surgiría de un adecuado balance de los mismos no solo en magnitud sino también en tiempo de aparición y velocidad de desarrollo.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abawi, G.S. y Grogan, R.G., 1975. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by Whetzelinia sclerotiorum. *Phytopathology* 65: 300-309.
- Adams, P.B. y Ayers, W.A., 1979. Ecology of Sclerotinia species. *Phytopathology* 69: 896-899.
- Akai, S. y Fukutomi, M., 1980. Preformed Internal Physical Defense. En: *Plant Disease: An Advanced Treatise*. Vol. V. Cap. 8 pp. 139-159 (J.G. Horsfall y E.B. Cowling eds.), Academic Press, New York.
- Alfenas, A.C.; Hubbes, M. y Couto, L., 1982. Effect of phenolic compounds from Eucalyptus on the mycelial growth and conidial germination of Cryphonectria cubensis. *Can. J. Bot.* 60: 2535-2541.
- Asada, Y.; Ohguchi, T. y Matsumoto, I., 1976. Biosynthesis of Lignin in Japanese Radish root Infected by Downy Mildew Fungus. En: *Biochemistry and Cytology of Plant Parasite Interaction*. Cap. 6. pp. 200-212. Kodansha Ital. (K. Tomiyama; J.M. Daly; I. Uritani; H. Oku y S. Ouchi, eds.).
- Auger, J.S. y Nome, F.H., 1970. Efecto de la edad en la predisposición de la Maravilla (Helianthus annuus L.) a la esclerotiniosis (Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary). *Agricultura Técnica* 30 (3): 161-165.
- Bateman, D.F., 1978. The dynamic nature of disease. En *Plant Disease: An Advanced Treatise*. (J.G. Horsfall y E.B. Cowling, eds.). Vol. 3 pp. 53-83. Academic Press, New York.
- Bateman, D.F. y Lumsden, R.D., 1965. Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to subseptibility to an isolate of Rhizoctonia solani. *Phytopat.* 55: 734-738.
- y Beer, S.V. 1965. Simultaneous Production and Synergistic Action of Oxalic acid and Polygalacturonase during Pathogenesis by Sclerotinia rolfsii. *Phytopath.* 55: 204-211.
- Beckman, C.H., 1980. Defenses triggered by the Invader: Physical Defenses. En: *Plant Disease: An Advanced Treatise* Cap. 12. pp. 225-245 (J.G. Horsfall y E.B. Cowling, eds.) Academic Press, New York.
- ; Mueller, W.C. y Mace, M.E., 1974. The Stabilization of artificial and Natural cell wall membranes phenolic infusion and its relation to wilt disease resistance. *Phytopath.* 64: 1214-1220.
- Bell, A.A., 1980. The time sequence of Defense. En *Plant Disease: An Advanced Treatise*. Vol. 5 Cap. 4 pp. 53-73 (Horsfall, J.G. y E.B. Cowling, eds.). Academic Press, New York.
- , 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 21-81.

- Bhaskaran, R. y Kandaswamy, T.K., 1978. Phenol metabolism of sunflower leaves as influenced by Alternaria helianthi infection. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.* 85 (2): 108-112.
- Boone, D.M., 1971. Genetics of Venturia inaequalis. *Ann. Rev. Phytopath.* 9: 297-318.
- Brisson, J.D.; Peterson, R.L.; Rauser, W.E. y Ellis, B.E., 1977. Correlated phenolic histochemistry using light, transmission, and scanning electron microscopy, with examples taken from phytopathological problems. *Scanning electron microscopy Vol. II. Proceedings of the workshop on other biological applications of the SEMISTEM IIT Research Institute Chicago, Illinois, USA.*
- Brown, S., 1966. Lignins. *An. Rev. Plant Physiol.* 17: 223-244.
- Browning, J.A.; Simons, M.D. y Torres, E., 1977. Managing host genes: Epidemiologic and genetic concepts. En: *Plant Disease: An Advanced Treatise.* (J.G. Horsfall y E.B. Cowling, eds.) Vol. 1. pp. 191-212. Academic Press. New York.
- Byrde, R.J.W., 1957. The varietal resistance of fruits to Brown rot. II The nature of resistance in some varieties of cidder apple. *J. Hort. Sci.*, 31: 188-227.
- , Fielding, A.H. y Williams, A.H., 1960. The role of oxidized polyphenols in the varietal resistance of apples to Brown rot. In *Phenolics in plants in health and diseases.* (J.B. Pridham, ed.) pp. 95-99. Pergamon Press. Oxford.
- Campbell, L.C.; Huang, J. y Payne, G.A., 1980. Defense at the Perimeter: The outer walls and the gates. En: *Plant Disease: An Advanced Treatise.* Vol. 5. Cap. 6. pp. 103-120. (J.G. Horsfall y E.B. Cowling eds.). Academic Press. New York.
- Campi, M.D., 1941. *Bol. Inf. Direc. San. Veg. Min. Agric. Nac.* 5: 24.
- Castello, W.J., 1969. *IDIA (Inf. Invest. Agri. INTA; Buenos Aires)* 258: 41.
- Carranza, J.M., 1973. *Rev. Fac. Agron. Univ. La Plata* 49: 221.
- , 1975. Lista de las causas de las enfermedades de los centros hortícolas de la República Argentina (Inédito) 41 págs.
- Carter, J.F., 1978. *Sunflower Science and Technology.* Amer. Soc. of Agronomy, Crop Sci. Soc. of Amer. Soil Sci. Soc. of Amer. Inc. Publ. Madison, Wisconsin, USA.
- Cohen, Y. e Ibrahim, R.K., 1975. Changes in phenolic compounds of sunflower infected by Plasmopara halstedii. *Can. J. Bot.* Vol. 53: 2625-2630.
- Corse, J.; Lundin, R.E. y Wais, A.C. Jr., 1965. Identification of several components of isochlorogenic acid. *Phytochemistry.* 4: 527-529.
- Craft, C.C. y Audia, W.V., 1962. Phenolic substances associated with wound-barriers formation in vegetables. *Bot. Gaz.* 211-219.
- Cruickshank, I.A.M., 1963. Phytoalexins. *Am. Rev. Phytopath.* 1: 351-374.

- _____, 1980. Defenses triggered by the Invader: Chemical Defenses. En: Plant Disease: An Advanced Treatise. Vol. 5 Cap. 13. pp. 247-264. (J.G. Horsfall y E.B. Cowling eds.). Academic Press. New York.
- _____, y D.R. Perrin, 1960. Isolation of a phytoalexin from Pisum sativum. L. Nature 187: 799-800.
- Currier, W.W., 1981. Molecular controls in the resistance of potato to late blight. TIBS: 191-194.
- Dabler, J.M.; Pappelis, A.J. y Be Miller, J.N., 1969. Effect of Phenolic Acids and Com Extracts upon spore germination of Diplodia zeae. Phytopath. 59: 1098-1101.
- Debnam, J.R. y Smith, M., 1976. Changes in the isoflavonas and pterocarpens of red clover on infection with Sclerotinia trifoliorum and Botrytis cinerea. Physiol. Plant Pathol. 9: 9-23.
- Dizeo de Strittmatter, C.G., 1980. Coloración con violeta de Cresyl. Bol. Soc. Arg. de Bot. XIX (1-2): 273-276.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.; Robst, PH. y Smith, F., 1956. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- Dueck, J. y Campbell, S.J., 1978. Resistance to Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary in sunflower. Proc. 8th Intern. Sunfl. Conf. Minneapolis, Minnesota. 305: 310.
- Fajardo, A.L., 1965. Empleo de productos quimioterapéuticos contra Sclerotinia sclerotiorum y S. minor sobre lechuga y girasol. MS Tesis Inst. de Patol. Veg. (INTA) Bs.As. Argentina.
- Fajemisin, J.M. y Hooker, A.L., 1974. Predisposition to Diplodia stalk rot in corn affected by three Helminthosporium leaf blights. Phytopath. 64: 1496-1499.
- Fawcett, C.H. y Spencer, D.M., 1968. Sclerotinia fructigena infection and chlorogenic acid content in relation to antifungal compounds in apple fruits. Ann. Appl. Biol. 61: 245-253.
- Feldman, J.M. y Pontis, R.E., 1960. Rev. Argent. Agron. 27: 15.
- Flood, A.E. y Kirkham, D.S., 1960. The effect of some phenolics compounds on the growth and sporulation of two Venturia species. In Phenolics in plants in Health and Diseases. (I. Pridham, ed). pp. 81-85. Pergamon Press. Oxford.
- Friend, J., 1971. Resistance of Potato to Phytophthora. In Fungal Pathogenicity and the Plant's Response. (J.W. Byrde y C.V. Cutting eds.). Academic Press. New York y London 488 pp.
- _____, 1976. Lignification in infected tissue. En Biochemical Aspects of Plant Parasite Relationships. Cap. 14. pp. 291-302 (J. Friend, y D.R. Threlfall eds.) Academic Press. New York.
- _____, 1977. Phenolic substances and Plant Disease. In recent advances in Phytochemistry. Vol. 12: Biochemistry of Plants Phenolics. pp. 557-588. (T. Swain; Harborne, J. y Van Sumere, Ch. eds.) Plenum Press. New York and London.

- Garber, E.D., 1956. A nutrition-inhibition hypothesis of pathogenicity. *Am. Nat.* 90: 183-194.
- Goodwin, T.W. y Mercer, E.I., 1972. *Introduction to Plant Biochemistry*. Pergamon Press, New York, 359 pp.
- Guer, 1965. Contribution a l'étude des acides phénoliques chez les lemnaées. Etude critique de leur activité inhibitrice de la croissance 2eme. These, Fac. Sci., Paris 49 p.
- Grodzinska-Zachwieja A., Kahl, W. y Warchel, A., 1967. Thin layer chromatography of chlorogenic acid isomers. *J. Chromatog.* 29: 362-368.
- Haars, A.; Chet, I. y Hüttermann, A., 1981. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur. f. For. Path.* 11: 67-76.
- Hammerschmidt, R. y Nicholson, R.L., 1977. Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. *Phytopathology* 67: 251-258.
- Hancock, J.G., 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* 56: 975-79.
- , 1967. Hemicellulose degradation in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum* *Phytopathology* 57: 203-206.
- , 1972. Changes in cell membrane permeability in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Physiol.* 49: 358-364.
- Hanson, K.R. y Zucker, H., 1963. The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hidroxicinamic acids. *J. Biol. Chem.* 238 (3): 1105-1115.
- Hara, I. y Matsubara, H., 1980. Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulen. V. Proteolytic activities involved in globulin degradation in ungerminated seeds. *Plant and cell Physiol.* 21 (2): 219-232.
- Harborne, J.B., 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman y Hall Ltd. London.
- Harris, P.J. y Hartley, R.D., 1976. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature.* 259 (5543): 508-510.
- Heber, E.; Bazzalo, M.E. y Stampacchio, M., 1985. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la susceptibilidad del girasol a la podredumbre basal (*Sclerotinia sclerotiorum* (L. De Bary). *Actas de la XI Cong. Int. de Girasol. Vol. 2: 369-374. Bs.As. Argentina.*
- Held, V.M., 1955. Physiological differences between a normal and a degenerate strain of *Sclerotinia trifoliorum*. *Phytopathology* 45: 39-42.
- Heiser, 1969. En Vrănceanu 1977.

- Higuchi, T., 1981. Biosynthesis of Lignin. En Plant Carbohydrates II. Extracellular carbohydrates. Vol. 13 B 199-224. de la Encyclopedia of Plant Physiology (W. Tanner y F.A. Loewus ed.) Springer-Verlag. Berlin.
- Hoes, J.A., 1975. Sunflower disease in Western Canada, pág. 425-438. En: Oil seed and pulse crops in Western Canada. A Symposium. J.T. Harapiak (ed.).
- Hollander, M. y Wolfe D.A., 1973. Nonparametric statistical methods. (J. Wiley & Sons eds.). New York.
- Horsfall, J.G. y Dimond, A.E., 1959. Plant Pathology. An advanced treatise. Vol. 1. The diseased plant. Academic Press, New York and London. 674 pp.
- Huang, H.C., 1978. Biological control of Sclerotinia wilt of sunflower by hyperparasits. Proc. 8th Intern. Sunfl. Conf. Minneapolis, Minnesota. pág. 311-319.
- _____ y Hoes, J.A., 1976. Penetration and infection of Sclerotinia sclerotiorum by Coniothyrium minitans. Can. Journal Bot. 54: 406-410.
- _____ y Dorrel, D.G., 1978. Screening sunflower seedlings for resistance to toxic metabolites produced by S. sclerotiorum. Canadian Journal of Plant Science 58 (4): 1107-1110.
- Hunter, R.E., 1974. Inactivation of pectic enzymes by polyphenols in cotton seedlings of different ages infected with Rhizoctonia solani. Physiol. Plant Path. 4: 151-159.
- _____, 1978. Effects of catechin in culture and in cotton seedlings on the growth and poligalacturonasa activity of Rhizoctonia solani. Phytopath. 68: 1032-1036.
- Ingham, J.L.V., 1973. Disease resistance in higher plants. The concept of preinfectious and postinfectious resistance. Phytopath. Z. 78: 314-335.
- Johnson, L.B. y Klisiemicz, J.M., 1969. Phytopath. 59: 469-472.
- Jurd, L., 1957. The detection of aromatic acids in plant extracts by the ultraviolet absorption spectra of their ions. Arch. Biochem. and Biophys. 66: 284-288.
- Khare, K.B. y Bompeix, G., 1976. Activities proteolytiques des Sclerotinia sclerotiorum et S. minor role possible lors de la pathogenese. Rev. Mycol. (Paris) 40: 65-84.
- Kirkham, D.S., 1954. Significance of the ratio between the water soluble aromatic and nitrogen constituents of apple and pear in the hot-parasite relationship of Venturia species. Nature Lond. 173: 690.
- _____. L.M., 1979. Delimitation of the Economically important Plant Pathogenic Sclerotinia species. Phytopathology 69 (8): 881-886.
- Koepe, D.E.; Rohrbaugh, L.M. y Wender, S.H., 1969. The effect of varying UV intensities on the concentration of scopolin and caffeoylquinic acids in tobacco and sunflower. Phytochem. 8: 889-896.

- _____ ; Rohrbaugh, L.M.; Rice, E.L. y Wender, S.H., 1970. Tissue age and caffeoilquinic acid concentration in sunflower. *Phytochem.* 9: 297-301.
- _____ ; Southwick V. y Bittell, S.E., 1976. The relationship of tissue chlorogenic acid concentration and leaching of phenolics from sunflowers grown under varying phosphate nutrient conditions. *Can. J. Bot.* 54 (7): 593-599.
- Koga, H.; Mayama, S. y Shishiyama, J., 1979. Correlation between the deposition of fluorescent compounds in papillae and resistance in barley against Erysiphe graminis hordei. *Can. J. Bot.* 58: 536-541.
- Kosuga, T., 1969. The role of phenolics in host response to infection. *Ann. Rev. Phytopath.* 7: 195-222.
- Kritzman, G. y Chet, I., 1980. The role of phenols in the pathogenicity of Botrytis alli. *Phytoparasitica* 8 (1): 27-37.
- Kuč, J.; Henze, R.E.; Ullstrup, A.J. y Quackenbusch, F.W., 1956. Chlorogenic and caffeic acids as fungistatic agents produced by potatoes in response to inoculation with Helminthosporium carbonium. *J. Am. Chem. Soc.* 78: 3123-3125.
- _____, 1957. A biochemical study of the resistance of potato tuber tissue to attack by various fungi. *Phytopathology* 47: 676-680.
- _____, 1972. Phytoalexins. *Ann. Rev. Phytopath.* 10: 207-232.
- _____, 1976. Phytoalexins. En: *Physiological Plant Pathology*. Vol. 4. 632-646 de *Encyclopedia of Plant Physiology*. (R. Heifefuss y P.H. Williams eds) Springer-Verlag. Berlin.
- _____, 1982. Induced Immunity to Plant Disease. *Bio. Sci.* 32 (11): 854-860.
- Lamarque, C., 1976. Elements de Biologie du Sclerotinia sclerotiorum sur Tournesol en France. *Informations Techniques. CETIOM. N°49*.
- Le Clerq, P., 1973. Influence of facteurs hereditaires sur la resistance apparent du tournesol a S. sclerotiorum. *Ann. Amélior. Plantes (Paris)* 23: 279-286.
- Leung, J.; Fenton, T.W. y Clandini, D.R., 1981. Phenolic components of sunflower flour. *J. Food Science.* 46: 1386-1393.
- Le Tourneau, D., 1979. Morphology. Cytology and Physiology of Sclerotinia species in Culture. *Phytopathology* 69 (8): 887-890.
- Lewis, R., 1953. An outline of the balance hypothesis of parasitism. *Am. Nat.* 87: 273-281.
- Luciano, A. y Davreaux, M., 1967. Producción de girasol en Argentina. *Publ. Técnica. Est. Exp. Agrop. Pergamino (Argentina)* 37: 38.
- Ludwig, R.A.; Spencer, E.Y. y Unwin, C.H. 1960. An antifungal factor from barley of possible significance in disease resistance. *Can. J. Bot.* Vol. 38: 21-29.
- Lukens, R.J., 1970. Melting out of Kentucky bluegrass, a low sugar disease. *Phytopath.* 64: 476-480.

- Lumsden, R.D., 1969. Sclerotinia sclerotiorum infection of bean and the production of cellulase. *Phytopathology*. 59: 653-657.
- _____, 1970. Phosphatidase of S. sclerotiorum produce in culture and in infected bean. *Phytopathology* 60: 1106-1110.
- _____, 1976. Pectolytic enzymes of S. sclerotiorum and their localization in infected bean. *Can. J. Bot.* 54: 2630-2641.
- _____, 1979. Histology and Physiology of Pathogenesis in Plant Diseases caused by Sclerotinia species. *Phytopathology* 69: 890-896.
- _____, y Dow, R.L., 1973. Histopathology of Sclerotinia sclerotiorum infection of bean. *Phytopathology* 63: 708-715.
- Marciano, P.; Di Lenna, P. y Magro, P. 1983. Oxalic acid cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two Sclerotinia sclerotiorum isolates on sunflowers. *Physiol. Plant Pathol.* 22: 339-345.
- Marchionatto, J.B., 1948. *Tratado de Fitopatología* Edic. Lib. del Colegio Bs.As. Argentina. Cap. 8 283 págs.
- Matsushita, K. y Uritani, I., 1974. Change in invertase activity in response to wounding and purification and properties of its invertases. *Plant Physiol.* 54: 60-66.
- Maxwell, D.P. y Lumsden, R.D., 1970. Oxalic acid production by Sclerotinia sclerotiorum infected bean and in culture. *Phytopathology* 60: 1395-1398.
- Mc Clure, T.T., 1960. Chlorogenic acid accumulation and wound healing in sweet potato roots. *Am. J. Bot.* 47: 277-280.
- Minamikawa, T. y Uritani, I., 1964. Phenilalanine deaminase and tyrosin deaminase in sliced or black-rot infected sweet potato roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 198: 573-574.
- Mitidieri, J.M., 1973. IDIA. Ing. Invest. Agric. INTA, Bs.As. Argentina. 301:19.
- Muntañola, M., 1955. *Rev. Agron. Noreste Argent. Tucumán*, 1: 283.
- Muse, R.R., 1974. Influence of nutrition on the development of Helminthosporium red leaf spot on seaside bent grass Agrostis palustris. *Physiol. Plant Pathol.* 4: 99-105.
- Newton, H.C., 1972. S. sclerotiorum incitant of lettuce drop source of inoculum, host resistance and mechanisms of pathogenesis. Ph D. Thesis Microfilms 72-4 292. Univ. Microfilms. Ind.
- Nichiforesco, E. y V. Coucou., 1965. Sur le dosage des o-dihydrophenols de type acide caféique présents dans les fenile d'Artichar (Cynara scolymuis). *Am. pharmaceutiques francaises* 23 (6): 419-427.
- Noyes, R.D. and J.G. Hancock., 1981. Role of oxalic acid in the Sclerotinia wilt of sunlower. *Physiol. Plant Path.* 18: 123-32.
- Nobles, M.K., 1948. *Estudies in forest pathology.* *Can. J. Res. C.*, 26: 281-431.

- Orellana, R.G., 1975. Photoperiod influence on the susceptibility of sunflower to Sclerotinia stalk rot. *Phytopathology* 65: 1293-1298.
- Okasha, K.A.; Ryugo, K.; Wilhelm, S. y Bringham, R.S., 1968. Inhibition of growth of Verticillium albo-atrum sporelings by tannis and polyphenols from infected crowns of Verticillium resistant and susceptible strawberry cultivars. *Phytopath.* 58: 1114-1117.
- Overeem, J.C., 1976. Preexisting antimicrobial substances in plants and their role in disease resistance. En: *Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships* (J. Friend y D.R. Threlfall eds) Academic Press. New York.
- Patil, S.S. y Dimond, A.E., 1967. Inhibition of Verticillium Polygalacturonase by oxidation product of polyphenols. *Phytopath.* 57: 492-496.
- Pawloski, S.H. y Hawn, E.J., 1964. Host-parasite relationships in sunflower wilt incited by Sclerotinia sclerotiorum as determined by the twin technique. *Phytopath.* 54 (1): 33-35.
- Poliakov, P.V., 1968. *Fiziol. Rast.*, 16 (4): 716-717.
- Populer, C., 1978. Changes in host susceptibility with time. En: *Plant Disease An Advanced Treatise. Vol. 2* (J.G. Horsfall y E.B. Cowling eds) Academic Press. New York, 436 pp.
- Pridham, J.B., 1960. *Phenolics in Plants in Health and Disease*. Pergamon Press, Oxford.
- Purdy, L.H., 1958. Some factors affecting penetration and infection by Sclerotinia sclerotiorum. *Phytopathology* 49: 605-609.
- _____, 1979. Sclerotinia sclerotiorum: History, Diseases and Symptomatology, Host range, Geographic Distribution and Impact. *Phytopathology* 69 (8): 875-880.
- _____, y Grogan, R.C., 1954. Physiological studies of Sclerotinia sclerotiorum in liquid and agar culture. *Phytopathology* 44: 36-38.
- Purushothaman, D., 1974. Phenylalanina Ammonia lyase and aromatic amino acids in Rice Varieties infected with Xanthomonas oryzae. *Phytopath. Z.*, 80: 171-175.
- Putt, 1958. Note an differences in susceptibility to Sclerotinia wilt in sunflowers. *Can. J. Plant Sci.* 38: 380-381.
- Reeve, R.H., 1951. Histochemical tests for polyphenol in plant tissues. *Stain Tech.* 26 (2): 91-96.
- Ribereau-Gayon, P., 1972. *Plants Phenolics* (Oliver y Boyd) Edimburgo.
- Ride, J.P., 1978. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. *Ann. Appl. Biol.* 89: 302-306.
- _____, 1980. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiol. Plant Pathol.* 16: 187-196.
- Robertson, N.F.; Friend, J.; Aveyard, M.A.; Brown, J.; Huffee, M. y Homans, A.L., 1968. The accumulation of phenolic acids in tissue culture combination of Solanum tuberosum and Phytophthora infestans. *J. Gen. Microbiol.* 54: 261-268.

- Robinson, P.W. y Hodges, C.F., 1977. Effect of nitrogen fertilization on free aminoacid and soluble sugar content of Poa pratensis and on infection and disease severity by Drechslera sorokiniana. *Phytopath.* 67: 1239-1244.
- Royle, D.J., 1976. Structural features of resistance to Plant Disease. En: *Biochemical aspects of Plant-Parasite Relationships*. Cap. 9 (J. Friend y D.R. Threlfall eds) Academic Press. New York. 354 pp.
- Sarasola, A.A., 1942. *Direc. Agric. Gan. Industr. Pcia. Bs.As.* 14 pp.
- _____ y M.A. Rocca de Sarasola, 1975. *Fitopatología. Curso Moderno*. Ed. Hemisferio Sur. Bs.As. 374 pp. (generalidades).
- Schaal, L.A. y Johnson, G., 1955. The inhibitory effect of phenolic compounds on the growth of Streptomyces scabies as related to mechanism of scab resistance. *Phytopath.* 45: 626-628.
- Schönbeck, F. y Schlösser, E., 1976. Preformed substances as potential protectants. En: *Encyclopedia of Plant Physiol., New Series*. Vol. 4: *Physiological Plant Pathol.* 655-678 (R. Heitefuss, y P.H. Williams eds), Springer-Verlag, Berlin.
- Schlösser, E., 1980. Preformed Internal Chemical Defenses. En: *Plant Disease: An Advanced Treatise*. Vol. V 161-177 (J.G. Horsfall y E.B. Cowling eds). Academic Press. New York.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J., 1979. *Biometría*. H. Blume edic. Madrid.
- Sridhar, R. y Ou, S.H. 1974. Biochemical changes associated with the Development of Resistant and Susceptible Types of Rice Blast Lesions. *Phytopath. Z.*, 79: 222-230.
- Steadman, J.R., 1979. Control of Plant Disease caused by Sclerotinia species. *Phytopath.* 69: 904-907.
- Sutherland, O.K., 1958. Preliminary classification of some naturally occurring hidroxycinamic acids through their ultra-violet spectra. *Arch. Biochem and Biophys.* 75: 412-417.
- Swain, T.; Harborne, J.B. y Van Sumere, 1977. *Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 12. *Biochemistry of Plant Phenolics*. Plenum Press. New York, 651 pp.
- Tena, M.; Lopez-Valbuena, R. y Jorrén, J., 1984. Induction of phenylalanina ammonia-lyase in hypocotyls of sunflower seedlings by light, excisin and sucrose. *Physiol. Plant* 60: 159-165.
- Thatcher, F.S., 1939. Osmotic and Permeability relations in the nutrition of fungus parasites. *Am. J. of Bot.* 26: 449-458.
- Thoday, M.A., 1922. On the organization of growth and differentiation in the stem of the sunflower. *Ann. Bot.* 36: 489-510.
- Thomas, C.A. y Allen, E.H., 1970. An antifungal Polyacetylene compound from Phytophthora-infected sunflower. *Phytopath.* 60: 261-263.
- Thompson, T.E.; Rogers, C.E.; Zimmerman, D.C.; Huang, H.G.; Whelan, E.D.P. y Miller J.F., 1978. Evaluation of Helianthus species for disease resistance and oil content and quality. *Proc. 8th Int. Sunfl. Conf.* Minneapolis, Minnesota, USA. 501-506.

- Uritani, I., 1976. Protein Metabolism. En: Encyclopedia of Plant Physiol., New Series. Vol. 4: Physiological Plant Pathol. 509-521 (R. Heitefuss y P.H. Williams eds) Springer-Verlag, Berlin.
- _____ y Stahmann, M.A., 1961. Changes in nitrogen metabolism in sweet potato with black rot. Plant Physiol. 36: 770-782.
- Vidhyasekaran, P., 1974. Possible role of sugars in restriction of lesion development in finger millet leaves infected with Helminthosporium tramera. Physiol. Plant Pathol. 4: 457-467.
- Virtanen, A. y Hietala, P.K., 1958. Isolation of an anti-Sclerotinia factor 7-hidroxi-4-methoxi-isoflavone from red clover. Acta Chem. Scand. 12: 579-580.
- Voigt, J., 1960. En: Les esters hidroxycinamiques de la pomme: identification variation au cours de la croissance du fruit et metabolisme, oor Macheix, J.J. These Doctorat, Fac. Sci. Paris. 1974. 168 pp.
- Vrânceanu, A.V., 1977. El Girasol. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Wade, G.C., 1956. Investigations on brown rot of apricots caused by Sclerotinia fructicola (Wint.) Rehm. The occurrence of latent infection in fruits. Australian J. Agric. Research. 7: 504-515.
- Williams, G.H. y Western, J.H., 1965. The Biology of Sclerotinia trifoliorum Erikss and other species of sclerotium-forming fungi. I. Apothecium formation from sclerotia. Ann. Appl. Biol. 56: 261-268.
- Yarwood, C.E., 1959. Predisposition. En: Plant Pathology: An Advanced Treatise (J.G. Horsfall y Dimond, eds) Vol 1: 521-562. Academic Press, New York.
- Yarwood, C.E., 1976. Modification of the Plant Response-Predisposition. En: Physiol. Plant Path. Vol. 4: 703-714. Encycl. Plant Physiol. (R. Heitefuss y P.H. Williams eds) Springer-Verlag. Berlin.
- Zimmer, D.E. y Hoes, J.A., 1978. Diseases. En: Sunflower Science and Technology 225-262 (J.F. Carter ed) ASA, CSSA, SSSA. Wisconsin.