

## MECANISMOS DE RESISTENCIA EN Helianthus annuus L. FRENTE A LA PODREDUMBRE BASAL (Sclerotinia sclerotiorum (L.) DE BARY)

M.E. Bazzalo\*; E. Heber\*; M.A. Del Pero de Martínez\*\* y O.H. Caso\*.

\* Centro de Ecofisiología Vegetal. CONICET-FECIC-FUND. M. LILLO.

\*\* Unidad Botánica, Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales, CONICET.

Serrano 665, 1414 Capital Federal. Argentina.

### Resumen

Se estudiaron los mecanismos de resistencia en distintos estadios del ciclo de vida de una línea isogénica del girasol, al ser inoculada experimentalmente con el micelio de S. sclerotiorum. Se analizaron plantas de tres edades cultivadas bajo condiciones controladas: I (estadio vegetativo), II (botón floral cerrado) y III (botón floral abierto). Al 5º día después de la inoculación, el 30% de las plantas del estadio II (II<sub>S</sub>) presentó severos síntomas de marchitez en todas sus hojas, y el total colapso de la médula en la parte basal del tallo. Dichos síntomas no fueron observados en el resto de las plantas de ese estadio (II<sub>T</sub>) ni en las de los estadios I y III. Se estudió el efecto sobre el crecimiento micelial in vitro (CM) de distintos extractos, obtenidos a partir de tallos controles e inoculados de las tres edades. Este indicó la presencia de mecanismos bioquímicos de resistencia. La cuantificación de compuestos fenólicos totales, solubles en metanol, presentes en tallos sanos y enfermos mostró la producción de un incremento postinfeccional de los mismos que fue significativamente mayor en las plantas tolerantes (I, II<sub>T</sub> y III). Mediante estudios cuali y cuantitativos se aisló, identificó y cuantificó el principal compuesto fenólico inhibidor del CM in vitro. Dichos estudios indicaron que se trata del ácido isoclorogénico. Este estuvo presente en los tallos sanos de las tres edades pero se incrementó significativamente en las plantas tolerantes. Adicionalmente, estudios de localización histoquímica indicaron su presencia en las zonas de infección, lo cual apoyaría su eventual rol en los mecanismos de resistencia in vivo. Se describe la presencia de barreras de tipo mecánico adicionales en los estadios I y III.

### Introducción

La podredumbre basal (S. sclerotiorum) es una enfermedad importante para el girasol no solo en la Argentina sino también en los principales países productores del mundo (Vrânceanu, 1977). Si bien no se ha logrado hasta el presente la resistencia absoluta frente a este patógeno existe un amplio rango de susceptibilidad entre los distintos híbridos y variedades existentes (Dueck et al., 1978). Auger y Nome (1970) encontraron que, a campo y en invernáculo, la susceptibilidad frente a S. sclerotiorum variaba en un mismo material de acuerdo con el estadio del ciclo ontogénico en que el girasol era inoculado experimentalmente. Sin embargo, no se conocen antecedentes bibliográficos previos sobre los mecanismos de resistencia en el girasol frente a esta enfermedad. En el año 1980 se inició una investigación tendiente a profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia involucrados en las diferencias de susceptibilidad que presentan distintos estadios de una línea isogénica del girasol; al ser inoculada experimentalmente con el mencionado patógeno.

### Materiales y Métodos

En todos los experimentos se utilizó una línea isogénica de girasol (# 33107, Cargill S.A.), y una cepa altamente virulenta de S. sclerotiorum (Nº16, mantenida en el Centro de Ecofisiología Vegetal). Se emplearon plantas de tres estadios: I (estadio vegetativo), II (botón floral cerrado) y III (botón floral

abierto). Las características de las plantas, las condiciones de crecimiento, el método de inoculación y la evaluación de la susceptibilidad se han descrito en un trabajo anterior (Bazzalo, 1982a). La susceptibilidad se midió hasta el 5º día después de la inoculación. Se estudiaron segmentos de tallos enfermos que contenían las lesiones (L), segmentos de zonas sanas adyacentes (SA) de 1 cm de longitud y porciones comparables de tallos de las plantas control. En todos los casos se descartó la médula. Las muestras fueron extraídas y analizadas utilizando técnicas cromatográficas, analíticas y espectrofotométricas standard para la identificación de compuestos fenólicos (Riberéau-Gayon, 1972). El contenido de fenoles solubles totales en los extractos obtenidos se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Bray y Thorpe, 1954). Se estudió el efecto de alícuotas de extractos metanólicos completos, compuestos fenólicos aislados individuales o en mezclas y de ácidos fenólicos comerciales sobre el crecimiento micelial *in vitro* (CM) del patógeno (Bazzalo, 1982b), en un medio mineral definido (Hancock, 1966). Los compuestos que exhibieron un efecto inhibitor significativo sobre el CM fueron identificados y cuantificados cromatográficamente y espectrofotométricamente según los métodos usuales (Riberéau-Gayon, 1972; Corse et al., 1965). Los fenoles solubles e unidos a paredes celulares se localizaron en cortes transversales de tallos sanos y enfermos mediante métodos de autofluorescencia bajo luz U.V. en un microscopio Zeiss. Los fenoles solubles fueron además localizados histoquímicamente mediante los reactivos de ClFe<sub>3</sub> y de Hoepfner (Brisson et al., 1977). Para observar el grado de lignificación de los tejidos se empleó la técnica del floroglucinol-HCl (Orellana, 1975).

#### Resultados

En el cuadro 1 se ha representado la evaluación de la susceptibilidad del girasol en función de la edad en que es inoculado con *S. sclerotiorum*. A través de todos los parámetros analizados pudo observarse que el estadio más susceptible fue el II, en tanto que los otros dos mostraron comportamientos semejantes. Dentro del estadio II fue posible distinguir un grupo de plantas que presentaban severos síntomas de marchitez en todas sus hojas, en las cuales el hongo había alcanzado la médula del tallo causando el vuelco del mismo. Dichas plantas fueron consideradas como muertas (III). Presentaban lesiones típicamente acuosas, castaño muy claras, con límites difusos y significativamente más largas al 4º y 5º día después de la inoculación (Fig. 1): Por el contrario las lesiones del resto de las plantas de edad II (II') al igual que las de los

Cuadro 1: Evaluación de la susceptibilidad de *H. annuus*, cultivado bajo condiciones controladas, en función de la edad de inoculación con *S. sclerotiorum*.

Parámetros al 5º día	Estadios		
	I	II	III
% plantas enfermas	83	100	92
% plantas muertas	0	30	0
Índice de severidad <sup>c</sup>	0,2	1,7	0
Long. X de lesiones (cm)	1,3a	2,9b	1,9ab
X de hojas con marchitez permanente (%)	0a	30b	0a

Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas al nivel del 5%.

c:  $\Sigma (N^\circ \text{plantas infectadas}) \times (\text{clase de severidad}) / (N^\circ \text{plantas inoculadas})$ . Clases de severidad: 0: plantas sin marchitez, 4: plantas con 100% de hojas con marchitez permanente.

estadios I y III fueron más pequeñas, de bordes limitados, castaño rojizo oscuro, superficiales y secas. Estas plantas no exhibían síntomas de marchitez y los tallos se mostraban firmes.

En la Fig. 2 se observa que los extractos provenientes de las plantas sanas promovieron el CM, independientemente del estadio de crecimiento. Los estadios de las distintas zonas de las plantas tolerantes (I, II<sub>T</sub> y III), y de las zonas SA de las plantas susceptibles IIS lo inhibieron. Sin embargo aquellos provenientes de las L de las plantas susceptibles no produjeron efectos sobre el CM. Se encontró un incremento significativo de los compuestos fenólicos solubles en aquellas zonas de las cuales provinieron los extractos inhibidores. Por otro lado no se observó tal incremento en las L de las plantas IIS (comparar Fig. 2 y Cuadro II). El análisis químico de los extractos demostró que no existen diferencias cualitativas entre plantas tolerantes y susceptibles. Comparando los perfiles cromatográficos de los extractos de las plantas control e inoculadas se encontró la aparición de algunos nuevos compuestos en estas últimas (Fig. 3). No se hallaron diferencias cualitativas entre los distintos estadios estudiados.

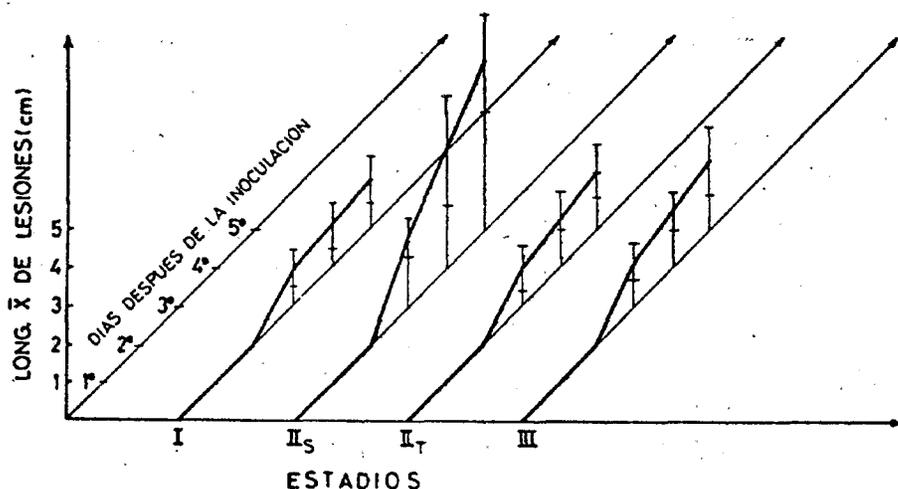
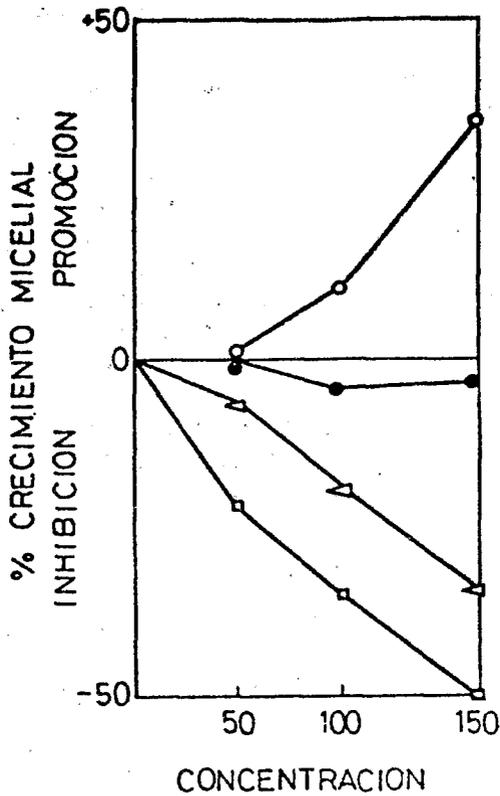


Figura 1: Velocidad de desarrollo de las lesiones fúngicas en función de la edad de hospedante en el momento de la inoculación.

En el cuadro IV se observa que la mezcla 3+3'+4 presentó la mayor inhibición sobre el CM. Los análisis químicos indicaron que se trata del ácido isoclorogénico. La hidrólisis básica de la misma liberó los ácidos cafeico y quínico. El ensayo biológico con distintas concentraciones de esta mezcla demostró que la concentración necesaria para producir un 50% de inhibición sobre el CM (CI 50) es de 0,3 mg de los comp. 3+3'+4/ml de medio). En las zonas L de las plantas tolerantes I, II<sub>T</sub> y III se encontraron concentraciones de ácido isoclorogénico que superan en gran medida los valores de CI determinados. En contraste las concentraciones halladas en las plantas control y susceptibles estuvieron muy por debajo de los valores mínimos inhibitorios (Cuadro V).

Los estudios de localización anatómica demostraron que los fenoles solubles se localizan en las zonas de infección (corteza, parénquima interfascicular y floema) independientemente de la edad del hospedante. Sin embargo, el número de células con contenido fenólico aumentó notoriamente en las plantas tolerantes respecto a las plantas control, mientras que en las plantas susceptibles



Cuadro II: Concentración de fenoles totales en distintas zonas de tallos control (C) e inoculados (I) de tres edades (mg/gr de peso fresco)

		Estadios			
		I	II <sub>S</sub>	II <sub>T</sub>	III
C	L	6,0a	4,7a	4,2a	3,5b
	SA	4,1a	4,2a	4,2a	3,2b
I	L	13,8d	6,0a	11,5d	9,3da
	SA	14,4d	10,0d	13,0d	9,6da

Valores seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas al nivel del 5%. L: zonas que incluyen lesiones o tejidos similares de las plantas control. SA: zonas sanas adyacentes.

Figura 2: Efecto de diferentes concentraciones de extractos metanólicos (mg de peso fresco/ml de medio) sobre el crecimiento micelial. o: plantas control; □: lesiones de plantas inoculadas tolerantes (I, II<sub>T</sub> y III); Δ: zonas SA de todas las plantas inoculadas y ●: lesiones de plantas inoculadas susceptibles (II<sub>S</sub>)

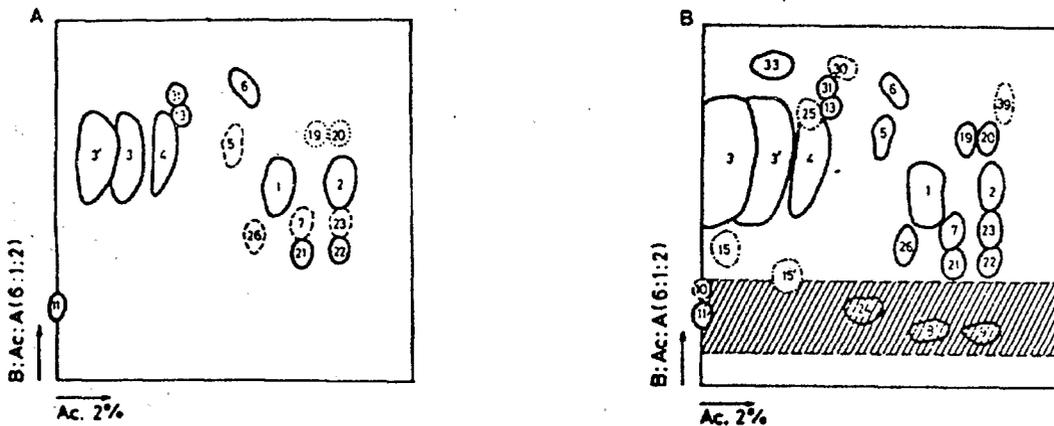


Figura 3: Perfiles cromatográficos de los extractos metanólicos provenientes de A: plantas control de los estadios I, II y III y B: plantas inoculadas de los estadios I, II<sub>T</sub>, II<sub>S</sub> y III.

---: solo en estadios I y II  
 ...: solo en estadios II y III

-.-: no siempre presente

▨: zona difusa comprendida entre Rf 0,1-0,3

Cuadro IV: Efecto de los principales compuestos fenólicos aislados de tallos susceptibles (IIS) y tolerantes (I) (300 mg peso fresco/ml de medio)

Compuesto N°	Efecto (% inhibición)	
	IIS	I
1 + 2	-10	-5
3+3'+4	-16	-40
5	-	-7
6	-10	0
7	+4	-6
15 + 15'	-13	-13
19 + 20	-17	-17
21 + 22 + 26	-10	-5
23	-8	-3
33	-	-13
Fr <sup>a</sup>	-25	-28

a: zona difusa comprendida entre los RF 0,1 y 0,3 en la dirección B:Ac:A.

no pareció incrementarse. Se encontró un mayor desarrollo del crecimiento secundario en la base de los tallos sanos del estadio III, acompañado de una extensiva lignificación. En las paredes celulares de las capas externas de la corteza de los tallos de las edades I y III, y del parénquima interfascicular de los de edad I, se observó la aparición de una fluorescencia postinfeccional que parece deberse a la formación de ésteres de ács. fenólicos con componentes de las paredes celulares.

En los hidrolizados básicos de los extractos metanólicos completos pudo verificarse la presencia de los ács. cafeico, ferúlico, p.cumárico y pHO benzoico. Pudo corroborarse que los compuestos 1 y 2 (ác. clorogénico), y los 3+3'+4 (ác. isoclorogénico) son ésteres de ácido cafeico; que los comps. 15 + 15' del ácido ferúlico y que los comps. 19 + 20 del ácido p. cumárico. Los ésteres del ácido pHO benzoico no fueron localizados. Como en numerosos casos son los ácidos libres los compuestos activos se probó el efecto de ácidos fenólicos comerciales sobre el CM. Se determinó que los CI 50 son: 0,5 mg/ml para el ácido cafeico y 1 mg/ml para los ács. ferúlico, p. cumárico y pHO benzoico.

#### Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento es posible concluir que las diferencias de susceptibilidad presentadas por los distintos estadios del girasol estudiados se deben por lo menos a dos tipos de mecanismos de defensa. Uno de tipo bioquímico, similar cualitativamente en los distintos estadios, y otro de tipo histológico dependiente de la edad del hospedante. A raíz de la infección fúngica se produce una alteración del metabolismo de los compuestos fenólicos en la planta lo que lleva a un incremento generalizado de compuestos preexistentes y a la aparición de otros no detectados en la planta sana. Hasta el presente se ha comprobado que solo uno de los más abundantes compuestos fenólicos preexistentes posee per se efectos inhibitorios sobre el CM. Se trata del ácido isoclorogénico el cual se acumula a concentraciones inhibitorias en las plantas tolerantes pero no en las susceptibles. En estas

Cuadro V: Concentraciones promedio de los compuestos 3+3'+4 en las lesiones de los tallos inoculados (I) y en tejidos similares de los tallos control (C) de los tres estadios estudiados (mg/gr de peso fresco)

	Estadios			
	I	IIS	III	III
C	0,09b	0,05b	0,05b	0,03b
I	1,4d	0,11bc	1,35d	0,45c

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

Últimas plantas es posible suponer que su velocidad de síntesis sería menor de tal forma que las concentraciones mínimas inhibitorias no pudieran alcanzarse a tiempo para frenar la infección. De tal forma el hongo podría extenderse y metabolizar los compuestos fenólicos impidiendo su acumulación en las lesiones. La localización periférica de los fenoles apoyaría la idea de su eventual relación con los mecanismos de resistencia. Esto está de acuerdo con el hecho de que las lesiones de las plantas tolerantes son superficiales involucrando únicamente los tejidos más externos del tallo (epidermis y corteza). El alto desarrollo del xilema secundario y la gran lignificación del mismo podría constituir una barrera mecánica efectiva en las plantas del estadio III dado la aparente imposibilidad de este patógeno para producir ligninasas. La eventual impregnación de paredes celulares no lignificadas con ácidos fenólicos podría conferir a las mismas resistencia a la degradación por las enzimas fúngicas en las edades I y III. Finalmente se ha comprobado que ácidos fenólicos libres cuyos ésteres no poseen efecto sobre el CM son inhibidores. La existencia de hidrolasas de la planta o del patógeno que pudieran llevar a los mencionados ésteres a sus formas activas podrían constituir mecanismos complementarios que deben ser objeto de futuros estudios.

Agradecimientos: Deseamos expresar nuestro profundo agradecimiento a la Dra. M. Alcubilla Martín; a los Ing. Agr. E. Teyssandier, F.H. Nome y D.H. Ginzo; y a la empresa Cargill S.A. quienes de uno u otro modo brindaron su apoyo para la realización de este trabajo. Igualmente a la Sra. Y. Torres por su valiosa colaboración técnica y al Servicio de Fotografía Científica del CONICET encargado de realizar la labor gráfica.

#### Bibliografía

- AUGER, J.S. y NOME, F.H. 1970. Efecto de la edad en la predisposición de la Maravilla (Helianthus annuus L.) a la esclerotinosis (Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary). Agricultura Técnica 30 (3), 161-165.
- BAZZALO, M.E. 1982a. Relación entre la edad de inoculación de Helianthus annuus crecido bajo condiciones controladas, y su susceptibilidad frente a Sclerotinia sclerotiorum. En: Actas del 2do. Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Bs. As. Argentina. En prensa.
- BAZZALO, M.E. 1982b. Estudios preliminares para la identificación de sustancias inhibitoras en Helianthus annuus del crecimiento in vitro de Sclerotinia sclerotiorum. En: Actas del 2do. Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Bs. As. Argentina. En prensa.
- BRAY, H.G. y THORPE, W.V. 1954. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. Methods of Biochemical analysis. 1, 27-52.
- BRISSON, J.D.; PETERSON, R.L.; ROBB, J.; 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. 2, 667-676.
- CORSE, J.; LUNDIN, R.E. y WAISS, A.C. 1965. Identification of several components of isochlorogenic acid. Phytochemistry. 4, 527-529.
- DUECK, J. y CAMPBELL, S.J. 1978. Resistance to Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary in Sunflower. In: Actas de la VIII Conferencia Internacional de Girasol, Minneapolis, Minnesota USA, 305-310.
- HANCOCK, J.G. 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by Sclerotinia sclerotiorum in Sunflower and Tomato stems. Phytopathology 56, 975-979.
- ORELLANA, R.G. 1975. Photoperiod influence on the susceptibility of sunflower to Sclerotinia stalk rot. Phytopathology 18, 123-132.
- RIBEREAU-GAYON, P. 1972. V.H. Heywood (ed.) Plants Phenolics. Oliver and Boyd. Edimburgh.
- VRANCEANU, A.V. 1977. El girasol. Mundi Prensa. Madrid.