

# FACTORES FISICOS Y LOCALIZACION ANATOMICA DE COMPUESTOS FENOLICOS EN RELACION CON LA TOLERANCIA DEL TALLO DEL GIRASOL (*HELIANTHUS ANNUUS*) FRENTE A *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*, CAUSAL DE LA PODREDUMBRE BASAL<sup>1</sup>

Por M. E. BAZZALO<sup>2</sup>, E. M. HEBER y O. H. CASO<sup>3</sup>

## SUMMARY

The anatomical localization of phenolic compounds, the development stage of the vascular system, and the volumen of different tissues in the mycelial growth zones of sunflower stems healthy and infected with *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, were studied. Plants from the tolerant I (vegetative), II<sub>t</sub> (closed flower-buds) and III (open flower-buds), and from the susceptible II<sub>s</sub> age-groups were used.

Soluble phenols were localized in some cells of the cortex in control plants irrespectively of age. In inoculated tolerant plants (I, II<sub>t</sub> and III) they were present in all cells of the cortex and phloem. Besides, phenols were also observed in all the cells of the interfascicular parenchyma and medullar parenchyma adjacent to vascular bundles of age I-plants. On the other hand, the number of cells of the cortex containing phenols in II<sub>s</sub>-plants was similar to that of the control ones.

The periferical localization of phenols was interpreted as a resistance factor, in the tolerant plants.

Three additional factors of tolerance could be: an extensive lignification in the stems of adults plants (II<sub>t</sub> and III), a post infectional melanization of the lesions only observed in the tolerant plants, and the phenolic acid impregnation of the cell walls of the outer layers of the cortex and the interfascicular parenchyma in age I as well as the outer layers of the cortex in ages II<sub>t</sub> and III.

## ANTECEDENTES

La podredumbre basal del girasol (*Helianthus annuus* L.) pro-

---

<sup>1</sup> Los presentes resultados forman parte del trabajo presentado por M. E. Bazzalo a la Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA, para optar al grado de Dra. en Cs. Biológicas. Fueron realizados en el Centro de Ecofisiología Vegetal (CEVEG) CONICET-FECIC-Fund. M. Lillo.

<sup>2</sup> Fac. Cs. Agrarias, UNMP. Ruta 226, km 73,5 C. C. 276, 7620. Balcarce, Pcia. Bs. As.

<sup>3</sup> CEVEG. Serrano 665, 1414, Bs. As.

ducida por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, es considerada una de las principales enfermedades parasitarias de este cultivo en todos los países productores (Gulya y Mac Arthur, 1984). El hongo penetra por el cuello o raíces de las plantas y produce, en los individuos susceptibles, la podredumbre de la base de los tallos (con total destrucción de la médula), y una severa marchitez foliar (Vrânceanu, 1977).

El control de esta enfermedad es problemático debido a varios factores entre los que se destacan la gran inespecificidad del patógeno (Purdy, 1979) y la ausencia de resistencia genética total. Sin embargo, se han hallado diferencias en susceptibilidad entre los distintos cultivares de girasol, frente a este hongo (Putt, 1958; Leclercq, 1973; Huang y Dorrel, 1978; Gulya, 1985).

Auger y Nome (1970) detectaron que, en condiciones de campo e invernáculo, el grado de tolerancia del hospedante varía con su edad en el momento de la inoculación. Esto ha sido confirmado con cultivos realizados en cámara bioclimática (Bazzalo, 1982 a). Este último trabajo permitió además establecer un sistema experimental para el estudio de los mecanismos de defensa del girasol frente a la podredumbre basal.

Otros estudios posibilitaron detectar un incremento de los compuestos fenólicos como consecuencia de la infección, en las lesiones y los tejidos sanos adyacentes de tallos en edades tolerantes (estadio vegetativo (I) y de botón floral abierto (III), Bazzalo *et al.*, 1985a).

El fenol predominante en los tallos sanos y que se acumula en mayor medida postinfeccionalmente, ha sido identificado como ácido isoclorogénico (Bazzalo *et al.*, *op. cit.*). Dicho compuesto posee efectos tóxicos sobre el crecimiento micelial y la formación de esclerocios *in vitro*, y sus concentraciones *in vivo* superan ampliamente los umbrales inhibitorios determinados (Bazzalo *et al.*, *op. cit.*).

Se sabe que el estadio de botón floral cerrado (II) es el de máxima susceptibilidad (Bazzalo, 1982a). Bazzalo *et al.*, (*op. cit.*) detectaron individuos susceptibles ( $II_s$ ) y tolerantes ( $II_t$ ), dentro del mismo. A su vez,  $II_s$  no acumulan fenoles significativamente mientras que  $II_t$  incrementan sus niveles a valores similares a los determinados en los estadios tolerantes (I y III). Estas evidencias estarían indicando una relación entre la tolerancia y el metabolismo fenólico (Bazzalo *et al.*, 1985b).

Dentro de los mecanismos de resistencia de las plantas es posible diferenciar tres grandes grupos: bioquímicos, anatómicos o físicos, y fisiológicos.

Royle (1976) considera que la colonización fúngica puede verse restringida a áreas discretas debido a la presencia de tejidos

resistentes a la degradación, tales como células lignificadas o suberificadas. En otros casos, ciertas barreras físicas se forman activamente como consecuencia de la infección (Beckman, 1980; Bell, 1981). Es importante destacar que no se conoce, hasta el momento, la producción de lignanas por parte de *S. sclerotiorum*, a pesar del completo sistema de enzimas degradativas que posee (Lumsden, 1979).

Por otra parte, para que una sustancia particular pueda ser asociada con la tolerancia, es preciso determinar que se halle presente en los tejidos invadidos por el patógeno (Wood, 1967).

Teniendo en cuenta las consideraciones previas, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) analizar la ubicación anatómica de los compuestos fenólicos en tallos sanos y enfermos; 2) determinar la existencia de diferencias en dicha localización entre los distintos estadios, que pudieran constituir un factor adicional de tolerancia; 3) estudiar el sistema vascular en las porciones de tallo atacadas, así como efectuar el cálculo de los volúmenes potencialmente acumuladores de fenoles y xilemáticos, en cada estadio.

#### MATERIALES Y METODOS

**Cultivo fúngico y línea de girasol.** Se utilizó el aislamiento 16 altamente virulento de *S. sclerotiorum*, el que se cultivó en medio agarizado con 1% de extracto de malta, a 27°C.

Las plantas de girasol (*H. annuus*) pertenecían a la línea isogénica de Cargill N° 33107. Las condiciones de cultivo se describieron en un trabajo anterior (Bazzalo, 1982a). Se utilizaron plantas en tres estadios descritos previamente (Bazzalo, *op. cit.*): vegetativo (I); botón floral cerrado (II) y botón floral abierto (III).

**Estudios anatómicos y localización de compuestos fenólicos.** Se realizaron cortes transversales del margen superior de las lesiones de los tallos inoculados, y de distintas alturas a partir de la base de los tallos testigo, al 5° día después de la inoculación. En cada experimento se analizaron 4 secciones de cada zona de 4 tallos, por edad.

Para el estudio de la localización de los fenoles solubles, y de aquellos unidos a paredes celulares, se usaron dos tipos de métodos.

- a) Histoquímicos:  $\text{FeCl}_3$  (Brisson *et al.*, 1977) y reactivo de Hoepfner-Vortzat (Reeve, 1951; Beckman y Mueller, 1969).
- b) De autofluorescencia a la luz UV en ausencia y presencia de vapores de amonio (Koga *et al.*, 1979; Harris y Hartley, 1976). Los cortes, montados en seco sobre portaobjetos, se

observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss con lámpara de mercurio HB 200, G365-LP420.

Para la detección histoquímica de los elementos lignificados se empleó el reactivo del floroglucinol-HCl (Higuchi, 1981).

*Hidrólisis de compuestos fluorescentes unidos a paredes celulares.* La presencia de compuestos fluorescentes esterificados a paredes celulares se determinó por: 1) incubación de los tejidos con celulasa (*Aspergillus niger*, Sigma), a 37°C durante 16 hs.; y 2) tratamiento con una solución de NaOH 1,0 M, a 20°C, durante 16 hs. (Harris y Hartley, 1976).

Un tipo de ensayo consistió en realizar las hidrólisis descriptas a cortes transversales de tallos, los que fueron observados antes y después de tratados con el microscopio de fluorescencia UV, para corroborar la desaparición de la fluorescencia de las paredes celulares. En otros casos, los tejidos se molieron y extrajeron exhaustivamente con metanol 80% a fin de descartar los fenoles solubles, y luego los residuos se hidrolizaron con celulasa según se describió. Los sobrenadantes obtenidos luego de la hidrólisis fueron acidificados con HCl concentrado a pH 3, y particionados con éter etílico. Las fases etéreas se llevaron a sequedad y analizaron por medio de cromatografía en papel unidimensional descendente, empleando para su desarrollo el sistema de solventes: butanol-ácido acético-agua (6:1:2) (Harborne, 1973). Los cromatogramas se observaron bajo luz UV. Las características cromatográficas de los compuestos fluorescentes se compararon con las de los ácidos fenólicos estándares.

*Cálculo de superficies y volúmenes de distintos tejidos del tallo.* Las superficies de los tejidos xilemático y "cortical" (parénquima cortical e interfascicular, y floema) se calcularon a partir de los pesos de los dibujos de cada tejido, en cortes transversales de tallos sanos, a distintas alturas a partir de la zona de inoculación. Los dibujos se realizaron con la cámara clara de un microscopio óptico sobre papel de calcar vegetal. Para calcular los volúmenes se adoptó el modelo del cono circular recto truncado:

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

h: longitud de la porción de tallo estudiada

R<sub>1</sub>: radio de la sección transversal inferior del tejido

R<sub>2</sub>: radio de la sección transversal superior del tejido

## RESULTADOS

**Proporción de los distintos tejidos según la altura del tallo y edad de la planta, en las zonas de crecimiento fúngico**

Las observaciones referidas a la anatomía del tallo coinciden estrechamente con las de Thoday (1922). El tallo exhibe crecimiento secundario que se inicia en la base y progresa hacia el ápice, a medida que las plantas envejecen. De esta forma, individuos de distintas edades presentan a una misma altura del tallo, un sistema vascular en distintas etapas de desarrollo (Tabla I).

En tallos inoculados, el "límite superior de la lesión" (l.s.) varía, al 5° día de la inoculación, con la edad y grado de tolerancia del hospedante (Bazzalo *et al.*, 1985 b). Si se tiene en cuenta este nivel, el crecimiento en l.s. para los tallos de las edades I (l.s.: 1 cm) y II<sub>s</sub> (l.s.: 4 cm) es primario, mientras que para II<sub>t</sub> (l.s.: 2 cm) es secundario incipiente y para III (l.s.: 1,5 cm) es secundario (Fig. 1).

Si a su vez se consideran las superficies de tejido "cortical" que el hongo debería atravesar para alcanzar el tejido xilemático, las mismas disminuyen levemente con la altura del tallo (Tabla II). Los menores valores están siempre presentes en los tallos de edad I, los mayores en los de la edad II y los intermedios en los de la III.

TABLA I

Estado de desarrollo del sistema vascular en función de la edad del hospedante. Las observaciones se efectuaron en cortes transversales del tallo, a distintas alturas a partir de la zona de inoculación (cero).

Altura (cm)	Edad°		
	I	II	III
0	secundario	secundario	secundario
1	secundario incipiente a primario	secundario a secundario incipiente	secundario
2	primario	secundario incipiente	secundario a secundario incipiente
3	primario	primario	secundario incipiente

° I: vegetativo; II: botón floral cerrado y III: botón floral abierto.

TABLA II

Superficies y volúmenes de tejido "cortical" (córtex, floema y parénquima interfascicular) y xilemático según la edad del hospedante, en las zonas de crecimiento fúngico.

Tejido	Altura (cm)	Edad°		
		I	II	III
C				
O Sup <sub>2</sub>	0	0,23ab	0,35a	0,29a
R (cm <sup>2</sup> )	1	0,17 <sup>b</sup>	0,36a	0,27ab
T	2	0,16 <sup>b</sup>	0,26ab	0,19ab
I				
C	0-1	0,21a	0,40 <sup>b</sup>	0,28ab
A Vol.	1-2	0,17a	0,34 <sup>b</sup>	0,27ab
L (cm <sup>3</sup> )	2-3	—	0,34 <sup>b</sup>	—
X				
I Sup <sub>2</sub>	0	0,13a	0,26 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>
L (cm <sup>2</sup> )	1	0,09a	0,22 <sup>b</sup>	0,23 <sup>b</sup>
E	2	0,06a	0,17ab	0,22 <sup>b</sup>
M				
A				
T Vol.	0-1	0,12a	0,26 <sup>b</sup>	0,27 <sup>b</sup>
I (cm <sup>3</sup> )	1-2	0,10a	0,20ab	0,22 <sup>b</sup>
C	2-3	—	0,17a	—
O				

Los valores son promedio de 4 repeticiones. Las comparaciones sólo son válidas dentro de superficies o volúmenes de cada tejido. Los valores seguidos de letras distintas indican diferencias significativas al 5%.

—: no realizado. I: vegetativo; II: botón floral cerrado y III: botón floral abierto.

Sin embargo, sólo se hallaron diferencias significativas entre los estadios I y II, a un cm de altura (Tabla II). Los valores del volumen del tejido "cortical" siguen las mismas tendencias antedichas, pero con diferencias más netas, las que se hacen significativas entre las edades I y II para las dos porciones del tallo consideradas (Tabla II).

Una vez alcanzado el tejido xilemático el hongo debería atravesar, en la zona de inoculación, un anillo continuo de dicho tejido, independientemente de la edad del hospedante (cfr. Tabla I). A pesar de ello, la superficie del xilema es menor en los tallos más jóvenes (I), y semejante en los de edades II y III (Tabla II). Estas diferencias se mantienen hasta los dos cm de altura, en que la superficie

TABLA III

Comportamiento de las paredes celulares frente a la luz UV antes y después de exposición al hidróxido de amonio y a la acción de la celulasa y al test del floroglucinol-HCl, en los márgenes de las lesiones de tallos inoculados y zonas similares de tallos sanos.

		Comportamiento de las paredes celulares		
		1	2	3
I	Edad			
	Estado sanitario			
	testigo	xilema y floema 1°, casquete de fibras	vasos cercanos al cámbium	ausente
	inoculado	idem testigo	idem testigo	parénquima cortical e interfacs.
II <sub>s</sub>	testigo	xilema y floema 1°, casquete de fibras	vasos cercanos al cámbium	ausente
	inoculado	idem testigo	idem testigo	ausente
II <sub>t</sub>	testigo	xilema y floema 1°, casquete de fibras	vasos cercanos al cámbium	ausente
	inoculado	idem testigo	idem testigo	parénquima cortical
III	testigo	xilema 1° y 2° floema 1°, casquete de fibras	vasos cercanos al cámbium	ausente
	inoculado	idem testigo	idem testigo	parénquima cortical

Comportamiento 1: fluorescencia azul que no vira con amonio y no desaparece con celulasa; floroglucinol RCl positivo. 2: fluorescencia azul que vira con amonio y no desaparece con celulasa; floroglucinol HCl positivo. 3: fluorescencia azul que vira con amonio y desaparece con celulasa; floroglucinol HCl negativo.

xilemática en los tallos de edad II adquiere valores intermedios, no significativamente diferentes de I ni de III, a pesar de presentar aún una disposición continua (cfr. Tablas I y II).

El volumen de xilema entre la zona de inoculación y el primer cm de altura es igual en los estadios II y III, y significativamente menor en el estadio más joven. En la porción comprendida entre

TABLA IV

pH del jugo celular extraído de las lesiones de tallos inoculados y tejidos similares de tallos testigos, de diferentes edades.

I		Edad°		III		
Testigo	Inoculado	Testigo	Inoculado	Testigo	Inoculado	
6,69 <sup>a</sup>	5,98 <sup>a</sup>	6,43 <sup>a</sup>	II <sub>t</sub> 5,70 <sup>a</sup>	II <sub>g</sub> 4,60 <sup>b</sup>	6,26 <sup>a</sup>	5,50 <sup>ab</sup>

Los valores son promedio de 3-4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas al 5%.

°: I: vegetativo, II: botón floral cerrado y III: botón floral abierto.

uno y dos cm de altura, el estadio I exhibe nuevamente el menor valor, el estadio III el mayor, y el II un valor intermedio que no se diferencia de los otros dos (Tabla II).

#### Localización anatómica de fenoles en los márgenes de las lesiones y tejidos similares de tallos sanos

Los métodos histoquímicos ofrecieron reacciones muy visibles de color rojo brillante en el caso del reactivo de Hoepfner-Vortzat, y verde grisáceo oscuro en el de  $\text{FeCl}_3$ . Se observó igual localización de los fenoles, independientemente de la técnica empleada; no obstante, el método de autofluorescencia resultó el más aconsejable dado que por medio del montado en seco de los cortes, la difusión de los fenoles al medio fue despreciable.

Sobre la base de la fluorescencia exhibida antes y después de exponer los cortes al hidróxido de amonio se distinguieron tres tipos principales de reacciones:

1) Paredes celulares azules que no viran de color. Según Harris y Hartley (1976), las paredes que presentan dichas características, que dan una reacción positiva con el test del floroglucinol-HCl, y no son degradadas por acción de la celulasa, estarían lignificadas.

2) Paredes azules que viran a azul más brillante o verde. Esta característica indicaría la presencia de ácidos fenólicos esterificados con componentes de las paredes. Si dichas paredes no dan reacción positiva con el test de floroglucinol-HCl, y la fluorescencia desaparece luego del tratamiento con celulasa, dichos ácidos estarían unidos a polisacáridos de paredes no lignificadas; de lo contrario constituirían unidades de ligamiento entre la lignina y los carbohidratos estructurales (Harris y Hartley, *op. cit.*).

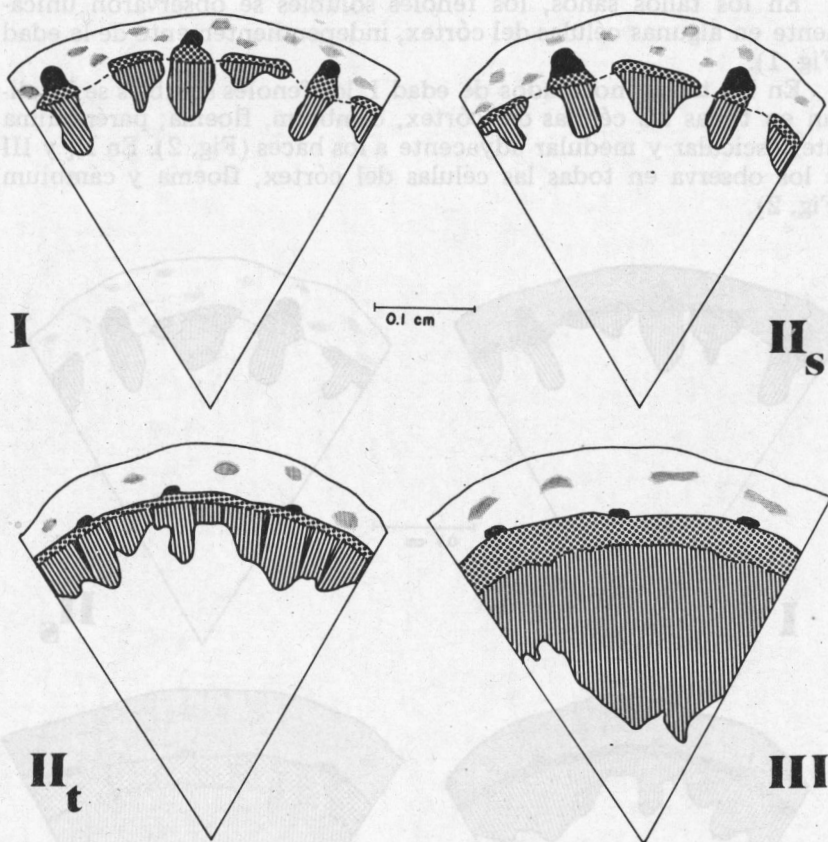


Fig. 1.— Desarrollo del sistema vascular y localización de fenoles solubles en tallos sanos de diversas edades. Los cortes transversales corresponden a alturas equivalentes al límite superior medio de las lesiones. Rayado fino: fenoles solubles; rayado grueso: xilema; punteado: floema; en blanco: parénquima. I: vegetativo; II<sub>s</sub>: individuos susceptibles con botón floral cerrado; II<sub>t</sub>: individuos tolerantes con botón floral cerrado y III: botón floral abierto.

3) Contenido celular 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 solubles más abundantes en los tallos sanos y que se acumulan en mayor medida en las interacciones tolerantes (Bazzalo *et al.*, 1985 a).

En los tallos sanos, los fenoles solubles se observaron únicamente en algunas células del córtex, independientemente de la edad (Fig. 1).

En los tallos inoculados de edad I, los fenoles solubles se localizan en todas las células del córtex, cámbium, floema, parénquima interfascicular y medular adyacente a los haces (Fig. 2). En II<sub>t</sub> y III se los observa en todas las células del córtex, floema y cámbium (Fig. 2).

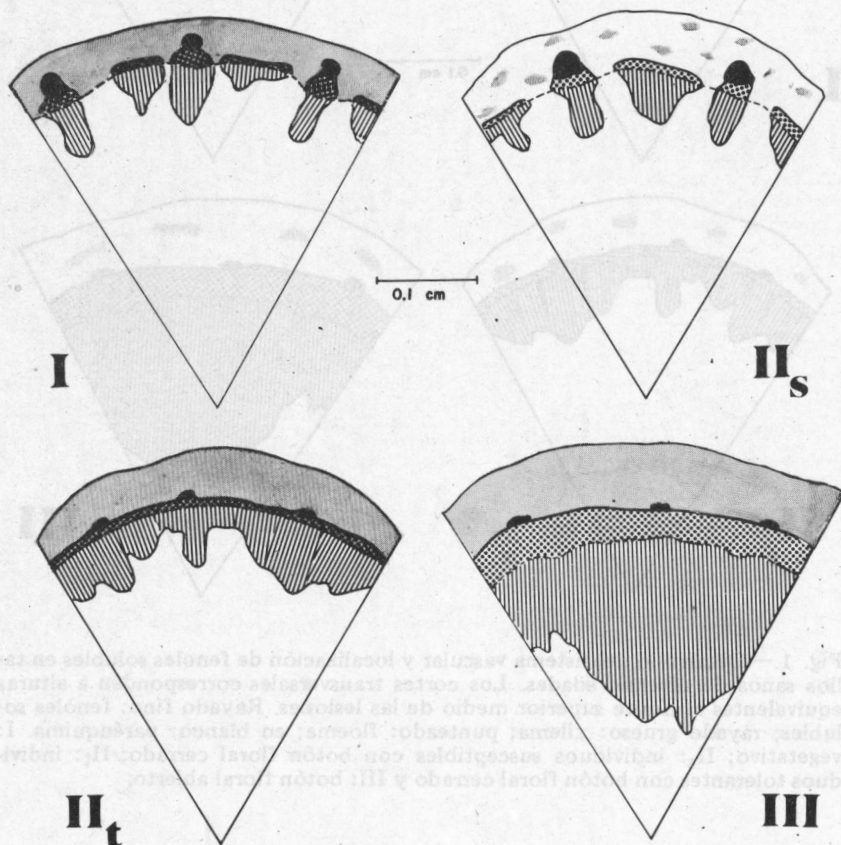


Fig. 2.— Desarrollo del sistema vascular y localización de fenoles solubles en tallos inoculados de diversas edades. Los cortes transversales corresponden al límite superior de las lesiones. Rayado fino: fenoles solubles; rayado grueso: xilema; punteado: floema; en blanco: parénquima; negro: casquetes de fibras. I: vegetativo; II<sub>s</sub>: individuos susceptibles con botón floral cerrado; II<sub>t</sub>: individuos tolerantes con botón floral cerrado y III: botón floral abierto.

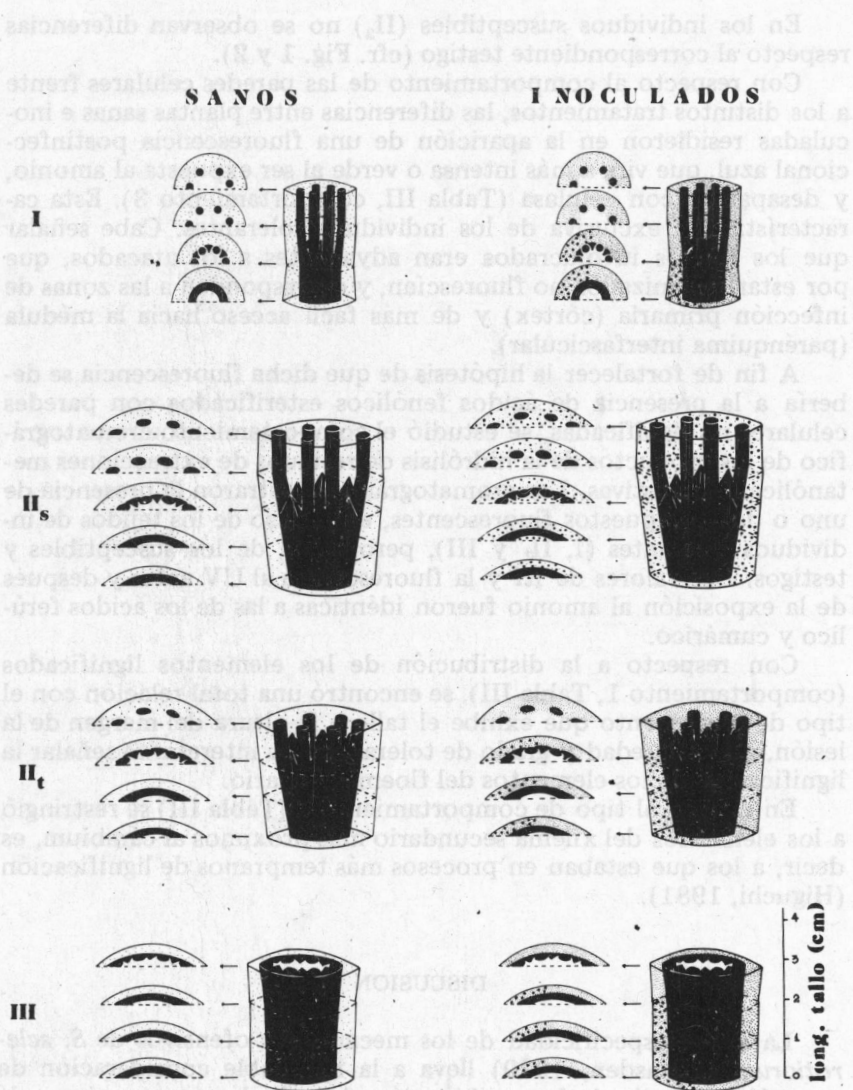


Fig. 3.— Desarrollo del sistema vascular y acumulación de fenoles solubles, como principales componentes de la defensa preinfeccional (xilema: en negro) y postinfeccional (fenoles solubles: punteado fino) que estarían relacionados con la limitación del crecimiento micelial (punteado grueso) en las edades e individuos tolerantes (I, II<sub>t</sub> y III). I: vegetativo; II<sub>s</sub>: individuos susceptibles con botón floral cerrado; II<sub>t</sub>: individuos tolerantes con botón floral cerrado y III: botón floral abierto.

En los individuos susceptibles ( $II_s$ ) no se observan diferencias respecto al correspondiente testigo (cfr. Fig. 1 y 2).

Con respecto al comportamiento de las paredes celulares frente a los distintos tratamientos, las diferencias entre plantas sanas e inoculadas residieron en la aparición de una fluorescencia postinfeccional azul, que vira a más intensa o verde al ser expuesta al amonio, y desaparece con celulasa (Tabla III, comportamiento 3). Esta característica es exclusiva de los individuos tolerantes. Cabe señalar que los tejidos involucrados eran adyacentes a los atacados, que por estar melanizados no fluorescían, y corresponden a las zonas de infección primaria (córtex) y de más fácil acceso hacia la médula (parénquima interfascicular).

A fin de fortalecer la hipótesis de que dicha fluorescencia se debería a la presencia de ácidos fenólicos esterificados con paredes celulares no lignificadas, se estudió el comportamiento cromatográfico de los productos de la hidrólisis de residuos de extracciones metanólicas exhaustivas. Los cromatogramas mostraron la presencia de uno o dos compuestos fluorescentes, en el caso de los tejidos de individuos tolerantes ( $I$ ,  $II_t$  y  $III$ ), pero no el de los susceptibles y testigos. Los valores de  $R_f$  y la fluorescencia al UV antes y después de la exposición al amonio fueron idénticas a las de los ácidos ferúlico y cumárico.

Con respecto a la distribución de los elementos lignificados (comportamiento 1, Tabla III), se encontró una total relación con el tipo de crecimiento que exhibe el tallo a la altura del margen de la lesión, según la edad y grado de tolerancia. Es interesante señalar la lignificación de los elementos del floema primario.

En cuanto al tipo de comportamiento 2 (Tabla III) se restringió a los elementos del xilema secundario más próximos al cámbium, es decir, a los que estaban en procesos más tempranos de lignificación (Higuchi, 1981).

#### DISCUSION

La alta inespecificidad de los mecanismos ofensivos de *S. sclerotiorum* (Lumsden, 1979) lleva a la indudable consideración de que sólo a través de la combinación de más de un mecanismo de defensa, desarrollados en la magnitud, lugar y momento adecuados, es posible alcanzar la tolerancia.

La lignificación de los tejidos del hospedante ha sido mencionada como una barrera constitutiva o que se desarrolla postinfeccionalmente en numerosas interacciones hospedante-patógeno (Friend, 1976). Como es sabido *S. sclerotiorum* sintetiza enzimas que hidrolizan laminilla media y pared celular, tales como celula-

sas, hemicelulasas, y pectinasas (Lumsden, *op. cit.*), pero aparentemente no produce lignanasas. Orellana (1975) sugiere que la tolerancia frente a este hongo, exhibida por girasoles cultivados bajo fotoperíodos largos, se debería a la mayor lignificación de los tallos bajo dichas condiciones lumínicas.

La presencia de un "cilindro" continuo de elementos lignificados en las zonas comprendidas entre la base del tallo y el límite superior de las lesiones en los individuos tolerantes del grupo II<sub>t</sub> y III, podría constituir una barrera mecánica preinfeccional que retarde el avance del hongo hacia la médula (Fig. 3).

¿Cómo explicar que los tallos jóvenes en estadio vegetativo (I) con un menor volumen "cortical" y xilemático, el que se hace discontinuo a un cm de altura, posean una tolerancia semejante a la de los tallos más gruesos y lignificados de los otros estadios?

En las plantas tolerantes la acumulación de fenoles solubles en las zonas periféricas del tallo proveería una protección postinfeccional de los tejidos en los que el hongo encuentra más facilitado su crecimiento, tales como las células no lignificadas del parénquima cortical e interfascicular. En el caso particular del estadio I, estos compuestos estarían "bloqueando" las "puertas de fácil acceso" hacia la médula (parénquima interfascicular). Adicionalmente, estudios previos muestran que si bien en todos los individuos tolerantes la concentración postinfeccional del ácido isoclorogénico supera con creces los umbrales inhibitorios determinados *in vitro*, ésta es significativamente mayor en I que en III (Bazzalo *et al.*, 1985 a). Es posible que la mayor concentración en I permita compensar el menor volumen de tejido acumulador por un lado, y la mayor debilidad estructural por otro (Fig. 3). Tampoco se debería descartar la acción de otros compuestos no solubles en metanol cuya existencia fue puesta parcialmente en evidencia, en un trabajo anterior (Bazzalo, 1982 b).

La aparición de una fluorescencia postinfeccional azul que viró a verde luego de su exposición al amonio, en paredes no lignificadas, interpretada como producto de la esterificación de ácidos fenólicos con polisacáridos constituyentes de las mismas, podría constituir por sí misma otro factor de tolerancia. Friend (1976) propone dos tipos de mecanismos a través de los cuales, alteraciones tales como las mencionadas podrían dificultar la degradación enzimática por parte del patógeno. Uno, como en el caso de la lignificación, consistiría en una barrera mecánica que se interpondría entre el patógeno y los carbohidratos de las paredes, con lo cual las enzimas fúngicas no entrarían en contacto con sus sustratos. Otro, como en el caso de los ácidos fenólicos esterificados a carbohidratos de la pared celular, consistiría en la alteración del sustrato polisacarídico de forma tal que impediría la formación del comple-

jo enzima-sustrato necesario para que tenga lugar la reacción hidrolítica. Cabe señalar que los ácidos ferúlico y cumárico, los que aparentemente estarían esterificados con las paredes celulares en los individuos tolerantes, inhiben el crecimiento micelial *in vitro* (Bazzalo *et al.*, 1985 b).

Como se describiera anteriormente (Bazzalo *et al.*, *op. cit.*), la tolerancia se asocia con la melanización de los tejidos (P: 0,01), en especial de aquellos que limitan las lesiones, independientemente de la edad del hospedante. Beckman *et al.*, (1974) demostraron que paredes artificiales de pectina-oxalato de calcio, impregnadas con productos de oxidación de fenoles, son resistentes a la degradación por el ácido oxálico. De igual modo, la impregnación natural de las placas perforadas de los vasos en raíces de banano con productos de oxidación similares confiere resistencia a la degradación por el mencionado compuesto (Friend, 1977). Ambos trabajos aportan una fuerte evidencia al rol de las melaninas como protectoras frente al ácido oxálico. Es importante recalcar que dicho compuesto constituye la principal toxina producida por *S. sclerotiorum* y actúa sinérgicamente con las enzimas degradativas de las paredes celulares (Lumsden, *op. cit.*).

Como consecuencia de lo expuesto, la combinación de los mencionados factores explicaría la limitación del crecimiento fúngico, a las zonas externas de los tallos tolerantes (Fig. 3).

Las diferencias entre el comportamiento de los grupos II<sub>t</sub> y II<sub>s</sub> se hacen visibles a partir del 4° día de la inoculación (Bazzalo *et al.*, 1985 b). Es en este momento en el que el crecimiento del hongo supera en los individuos II<sub>s</sub> los dos cm de altura, alcanzando las zonas en las que el tallo exhibe crecimiento prácticamente primario (Tabla I) y en las que el volumen de xilema es menor (Tabla II). Es decir, el patógeno arriba a zonas en las que se reduce la resistencia de tipo mecánico. Adicionalmente, la determinación del pH del jugo celular demostró que en estos individuos dicho factor adquiere valores cercanos a 4, en tanto que en los tolerantes se aproxima a 6 (Tabla IV). Este hecho explicaría la menor melanización de los tejidos en los individuos susceptibles ya que Marciano *et al.*, (1983) han demostrado que a pH 4 se favorece el efecto inhibitorio del oxálico sobre la actividad de las polifenoloxidasas en el girasol.

La debilidad estructural hallada por el hongo en los individuos II<sub>s</sub> a partir del 4° día, sumada a la ausencia de melanización e impregnación de las paredes celulares con ácidos fenólicos, y a la menor acumulación de fenoles solubles o el cese de la misma, explicarían el crecimiento fúngico explosivo observado a partir de ese momento (Fig. 3). Más aún, el mayor volumen de tejido "cortical", no acumulador de fenoles en este estadio, podría consti-

tuirse en un factor predisponente al ofrecer una fuente nutritiva fácilmente degradable por el patógeno.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Ing. Agr. H. D. Ginzo y al Dr. C. Barassi por la lectura crítica del manuscrito, y a las Sras. Y. Torres y C. Dizeo por su hábil cooperación técnica.

#### BIBLIOGRAFIA

- AUGER, J. S. y F. H. NOME. 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.
- BAZZALO, M. E. 1982 a. Relación entre la edad de inoculación de *Helianthus annuus*, cultivado bajo condiciones controladas, y su susceptibilidad frente a *Sclerotinia sclerotiorum*. *Actas del II Congreso Latinoamericano de Fitopatología*. Tomo I: 205-213. Buenos Aires.
- , 1982 b. Estudios preliminares para la identificación de sustancias inhibidoras en *Helianthus annuus* del crecimiento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Actas del II Congreso Latinoamericano de Fitopatología*. Tomo I: 172-181. Buenos Aires.
- , E. M. HEBER, M. A. DEL PERO de MARTINEZ y O. H. CASO. 1985 a. Phenolic compounds in stems of sunflower plants inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and their inhibitory effects on the fungus. *Phytopathol. Z.* 112: 322-332.
- , 1985 b. Mecanismos de resistencia en *Helianthus annuus* L. frente a la podredumbre basal (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary). *Actas de la XI Conferencia Internacional de Girasol*. Tomo II: 605-610. Mar del Plata.
- BECKMAN, C. H. 1980. Defenses triggered by de invader: Physical Defenses. En J. G. Horsfall & E. B. Cowling (Edits.) *Plant Disease: An Advanced Treatise* Vol. 5, Cap. 12: 225-245. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York.
- , W. C. MUELLER & M. E. MACE. 1974. The stabilization of artificial and natural cell wall membranes by phenolic infusion and its relation to wilt disease resistance. *Phytopathology* 64: 1214-1220.
- BELL, A. A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Rev. Pl. Physiol.* 32: 21-81.
- BRISSON, J. D., R. L. PETERSON, J. ROBB, W. E. RAUSER & B. E. ELLIS. 1977. Correlated phenolic histochemistry using light, transmission, and scanning microscopy with examples taken from phytopathological problems. *Proceedings of the Workshop on Other Biological Applications of the SEM/STEM IIT Research Institute. Scanning Electron Microscopy* Vol. II: 667-676. Chicago.
- FRIEND, J. 1976. Lignification in infected tissue. En: J. Friend & D. R. Threlfall (Edits.) *Biochemical Aspects of Plant Parasite Relationships* Cap. 14: 291-302. Academic Press. New York.

- , 1977. Phenolic substances and Plant Disease. En: T. Swain, J. Harborne & Ch. Van Sumere (Edits.) *Recent Advances in Phytochemistry* Vol. 12: 557-588. Plenum Press, New York.
- GULYA, T. J. 1985. Evaluation of sunflower germplasm for resistance to *Sclerotinia* stalk rot and Race 3 Downy Mildew. *Actas de la XI Conferencia Internacional de Girasol*. Tomo II: 349-353. Mar del Plata.
- , & R. A. MAC ARTHUR. 1984. Sunflower diseases: distribution and severity during the 1984 growing season in the north central region. *Proceedings Sunflower Research Workshop*, Fargo, North Dakota.
- HARBORNE, J. B. 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman & Hall Ltd, London.
- HARRIS, P. J. & R. D. HARTLEY. 1976. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the *Gramineae* by ultraviolet microscopy. *Nature* 259: 508-510.
- HIGUCHI, T. 1981. Biosynthesis of Lignin. En: W. Tanner & F. A. Loewus (Edits.) *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 13 B: 199-224. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- HUANG, H. C. & D. G. DORREL. 1978. Screening of sunflower seedlings for resistance to toxic metabolites produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canad. J. Pl. Sci.* 58 (4): 1107-1110.
- KOGA, H., S. MAYAMA & J. SHISHIYAMA. 1979. Correlation between the deposition of fluorescent compounds in papillae and resistance in barley against *Erysiphe graminis hordei*. *Canad. J. Bot.* 58: 536-541.
- LECLERQ, P. 1973. Influence of facteurs hereditaires sur la resistance apparent du tournesol a *Sclerotinia sclerotiorum*. *Ann. Amélior. Pl.* 23: 279-286. Paris.
- LUMSDEN, R. D. 1979. Histology and Physiology of Pathogenesis in Plant Diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 890-896.
- MARCIANO, P., P. DI LENNA & P. MAGRO. 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. Pl. Path.* 22: 339-345.
- ORELLANA, R. G. 1975. Photoperiod influence on the susceptibility of sunflower to *Sclerotinia* stalk rot. *Phytopathology* 65: 1293-1298.
- PURDY, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host range, Geographic Distribution and Impact. *Phytopathology* 69 (8): 875-880.
- PUTT, E. D. 1958. Note on differences in susceptibility to *Sclerotinia* wilt in sunflowers. *Canad. J. Pl. Sci.* 38: 380-381.
- REEVE, R. H. 1951. Histochemical tests for polyphenol in plants tissues. *Stain Technology* 26 (2): 91-96.
- ROYLE, D. J. 1976. Structural features of resistance to Plant Disease. En: J. Friend & D. R. Threlfall (Edits.) *Biochemical Aspects of Plant Parasites Relationships* Cap. 9. Academic Press, New York.
- THODAY, M. A. 1922. On the organization of growth and differentiation in the stem of sunflower. *Ann. Bot.* 36: 489-510.
- VRANCEANU, A. V. 1977. *El Girasol*. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- WOOD, R. K. S. 1967. *Physiological Plant Pathology*. Blackwell, Oxford and Edinburgh.