

## Tesis de Licenciatura

# Podredumbre del capítulo de Helianthus annuus causada por Sclerotinia sclerotiorum : Histopatología y microflora de variedades tolerantes y susceptibles

Rodríguez, María Alejandra

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

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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 Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rodríguez, María Alejandra. ( ). Podredumbre del capítulo de Helianthus annuus causada por Sclerotinia sclerotiorum : Histopatología y microflora de variedades tolerantes y susceptibles. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000677\\_Rodriguez](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000677_Rodriguez)

Cita tipo Chicago:

Rodríguez, María Alejandra. "Podredumbre del capítulo de Helianthus annuus causada por Sclerotinia sclerotiorum : Histopatología y microflora de variedades tolerantes y susceptibles". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000677\\_Rodriguez](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000677_Rodriguez)

**EXACTAS**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ciencias Biológicas

TESIS DE LICENCIATURA  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FCE y N BIBLIOTECA

Podredumbre del capítulo de *Helianthus annuus* causada por  
*Sclerotinia sclerotiorum*. Histopatología y micoflora de variedades  
tolerantes y susceptibles.

Autora: María Alejandra Rodríguez  
Directora: Dra Alicia Godeas  
Codirectora: Dra Nadia Venedikian

Lugar de trabajo: Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

Diciembre 1998

Nº 0677

*A la memoria de mi mamá, Rosa quién me apoyó  
en cada uno de mis proyectos y me brindó  
toda su alegría y su amor.*

## Agradecimientos:

A la Dra Alicia Godeas por permitirme integrar su grupo de trabajo, por alentarme y por tenerme paciencia.

A la Dra Nadia Venedikian por dirigirme, ayudarme y escucharme y por acercarme nuevamente a esta facultad y a esta carrera.

A la Dra Maria Eugenia Bazzalo por su ayuda en los comienzos de este trabajo, por su buena predisposición para explicarme.

A los directores del Centro Experimental de la Empresa Zeneca-Balcarce y a sus empleados por lo bien que me trajeron.

A la Dra Elena Ancibor por brindarme su experiencia y ayuda y por abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Dra María A. Castro (Marilin) porque es una genia, por tener siempre tan buena predisposición, por su ayuda invaluable y por ser tan buena gente.

A la Dra Beatriz Galati por ayudarme en la primeras observaciones y con el uso del micrótomo y por hacerlo con tanta amabilidad.

A la Lic. Viviana Chiochio por aconsejarme y permitirme confiar en ella; por ser tan buena compañera.

A la Dra Ana Menéndez, por cederme parte de la bibliografía empleada.

A la Lic. Alicia Martínez por su ayuda en las identificaciones y mucho más.

A la Dra Susana Martínez y a todos los demás habitantes del 12.

A la señora Mercedes por su colaboración en la esterilización de materiales y medios.

A mis hermanas Analía y Patricia por quererme y cuidarme.

A Eugenia por prestarme su compu, por soportarme desde hace casi 15 años y a pesar de todo seguir siendo mi amiga. Por ser incondicional.

A Gloria por ser mi amiga, por comprenderme y aconsejarme. Por alentarme.

A Daniela porque es una gran amiga siempre dispuesta, por ayudarme en los momentos críticos.

A Leandro, ya que estamos, por ser mi amigo y aguantarme en los momentos de  
...histeria, tal vez?

A mi padre por su apoyo económico.

A Ituzaingo's boy porque si.

Al lector por tener la paciencia de leer los agradecimientos hasta el final.

## ÍNDICE:

	Pág.
Resumen	1
Introducción	3
Planta hospedante	4
Agente causal	5
Condiciones para la infección y sintomatología	8
Histopatología del ataque	12
Bioquímica del ataque	13
Formas de resistencia ante el ataque de un patógeno	15
Antecedentes de estudios anatómicos, morfológicos y bioquímicos del ataque del patógeno sobre girasol	18
Formas de control	21
Objetivos	27
Materiales y métodos	
Parte I: Estudio del ataque sobre las piezas florales	
1.1- Planta hospedante	28
1.2- Hongo patógeno	29
1.3- Cosecha del material	30
1.4- Reaislamiento del patógeno	30
1.5- Preparación de los bloques de parafina	31
1.6- Cortes	34
1.7- Desparafinado y coloración de cortes	34
1.8- Observaciones	35
1.9- Estadística	35
Parte II: Obtención de cepas fúngicas a partir de “antósfera”.	
Selección de antagonistas	
2.1- Aislamiento a partir de material lavado	37
2.2- Aislamiento de endofitos	39
2.3- Identificación de las cepas fúngicas aisladas	40
2.4- Determinación de la frecuencia de las cepas fúngicas	40
2.5- Evaluación de la actividad antagónica	41
Anexo I	43
Resultados	
Parte I Estudio del ataque sobre las piezas florales	
1.1 Caracteres morfológicos y sintomatología de las inflorescencias	
1.1.1 Variedad HA 302	45
1.1.2 Variedad HA 89	45
1.2 Reaislamiento del patógeno	46
1.3 Pruebas preliminares	46

<b>1.4 Descripción del ataque se <i>S. sclerotiorum</i> en las distintas piezas florales en las dos variedades</b>	
<b>1.4.1 Variedad HA 302</b>	
Tiempo 1	47
Tiempo 2	50
Tiempo 3	53
<b>1.4.2 Variedad HA 89</b>	
Tiempo 1	58
Tiempo 2	59
Tiempo 3	62
<b>1.5 Análisis estadístico</b>	68
<b>Parte II Obtención de cepas fúngicas a partir de “antósfera”.</b>	
<b>Selección de antagonistas</b>	
<b>2.1 Identificación de las cepas y detreminación de sus frecuencias totales</b>	72
<b>2.2 Frecuencia de especies fúngicas discriminada por variedad y por pieza floral</b>	
<b>2.2.1 Variedades susceptibles</b>	74
<b>2.2.2 Variedades tolerantes</b>	76
<b>2.3 Selección de antagonistas</b>	80
<b>2.3.1 Variedades susceptibles</b>	81
<b>2.3.1 Variedades tolerantes</b>	83
<b>2.4 Aislamiento de endofitos a partir de ovario</b>	94
<b>Discusión y conclusiones</b>	96
<b>Bibliografia</b>	103

## **RESUMEN**

De acuerdo con las observaciones realizadas puede decirse que a las 24 hs de la inoculación hay abundante desarrollo sobre todo entre los granos de polen en las dos variedades. A los 6 días hay invasión de los tejidos de las anteras; en la variedad susceptible además hay desarrollo en los tejidos de la corola. A los 12 días hay penetración y desarrollo en el estigma, estilo y corola de las dos variedades, siendo mayor en la variedad susceptible. En esta última el patógeno llega a la parte superior del ovario.

En la variedad tolerante se observa el colapso celular en los tejidos de la corola y el estilo. En la variedad susceptible también hay cierto colapso en el estilo; pero éste no impide el desarrollo del patógeno. Justamente a través de su crecimiento a través del estilo alcanza a colonizar el ovario. Por otra parte en la variedad tolerante los tejidos de la corola sobre todo y del estilo, aunque en grado menor, se colorean de rojo, es decir toman con safranina. Esta reacción se presenta sólo frente al patógeno y constituiría una respuesta inducida por éste lo mismo que el colapso celular.

El ACP muestra la segregación de las dos variables en el tercer muestrado, estando caracterizada la variedad susceptible por la presencia del patógeno en la porción inferior de los filamentos, dentro de los tejidos del estilo y del ovario.

Las mayores diferencias entre variedades se presentan a los 12 días. La presencia de nectarios en la base del estilo, podría favorecer el desarrollo en la variedad susceptible. Los tejidos de la corola y del estilo de la variedad tolerante, al colapsarse y por su reacción que determina que las paredes celulares tomen con safranina lo mismo que, en ciertas zonas, su contenido, impedirían el avance del patógeno.

Las especies fúngicas aisladas tanto de variedades tolerantes como susceptibles fueron: *Alternaria alternata*, *A. citri*, *A. clamydospora*, *A. raphani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium sambucinum*, *Penicillium spp.* y varias especies de levaduras. Se aislaron sólo de variedades tolerantes *A. cheiranti*, *A. radicini*, *C. sphaerospermum*, *Drechslera indica*, *Fusarium graminearum* y *Phoma glomerata*. Sólo de variedades susceptibles se aisló *Cladosporium cucumerinum*.

La "antósfera" de las variedades tolerantes tiene 50-76.59 % de especies antagónicas, mientras que las variedades susceptibles 18-35.29 %. Presentaron mayor actividad antagónica aislamientos pertenecientes a las siguientes especies: a) *A. citri*, *A.*

*radicimi*, *F. graminearum* y varias especies de levaduras con grado de reacción de tipo D5; b) *E. purpurascens*, *A. alternata*, *A. citri* y *A. clamydospora* con grado de reacción de tipo D3 y c) *F. graminearum* y *F. sambucinum* con grado de reacción de tipo D2++. La mayoría de ellos aislados a partir de variedades tolerantes.

La población fúngica antagonista contribuiría en las variedades tolerantes a retrasar el ataque del patógeno y actuaría como uno de los factores junto con la reacción de los tejidos que determinan el comportamiento diferencial de las variedades frente al patógeno.

## **INTRODUCCIÓN**

El girasol, uno de los principales cultivos oleaginosos en Argentina, es una planta oriunda del SE de EE.UU. y del N de Méjico.

Su cultivo en nuestro país se lleva a cabo desde hace unos 150 años, pero adquirió fundamental importancia a partir de 1930. Desde hace unos años la Argentina figura entre los primeros países productores.

Es uno de los 4 cultivos más utilizados junto con la soja, el maní y la colza, para la obtención de aceite comestible. En Argentina constituye la fuente básica de producción de aceite comestible destinado al consumo humano, desde hace más de 30 años (Bazzalo, 1986).

El marchitamiento y podredumbre del tallo y capítulo del girasol son causados por el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Se identificó originalmente sobre este hospedante en 1861, desde entonces ha sido citado en todas las regiones del mundo donde se cultiva girasol (Gulya et al, 1997). También produce el ataque de yemas terminales (Tourvielle et al, 1992).

El patógeno prevalece con temperaturas tanto de regiones tropicales como subtropicales (Gulya et al, 1997)). Se ha observado que con temperaturas cercanas a los 0°C o bien superiores a 32°C, *S. sclerotiorum* es menos activo (Tourvielle et al, 1992).

Las pérdidas causadas por este organismo son realmente significativas en todas las regiones del mundo. El impacto sobre la producción de grano depende del estado de crecimiento en el que se encuentran las plantas infectadas.

La infección sobre la base del tallo y las raíces puede empezar tempranamente en plántulas jóvenes y matarlas antes de que se produzca la floración, por lo tanto en estos casos la producción es nula. Sin embargo, la mayoría de las plantas son infectadas durante la antesis y el desarrollo de las semillas, de modo que se puede reducir en forma considerable la producción y la calidad de las mismas (Gulya et al, 1997).

De acuerdo con Purdy (1979) el ataque causado por *S. sclerotiorum* puede causar pérdidas de hasta el 100%. Éstas se calculan en millones de dólares anuales ya sea en forma directa por pérdida del hospedante, o en forma indirecta causando disminución de la calidad del producto. Otra forma de pérdida lo constituye la disminución en la producción debido al reemplazo de los hospedantes por cultivos menos lucrativos.

El marchitamiento en girasol causado por *S. sclerotiorum* es la enfermedad más

importante en Canadá y EE. UU.. Sin embargo la podredumbre del capítulo es en general menos importante dadas las condiciones de baja humedad del suelo que disminuyen la germinación carpogénica (Gulya et al, 1997).

*S. sclerotiorum* es el principal causante de enfermedades en especial en áreas donde se practica la rotación de cultivos empleándose cultivos susceptibles tales como lechuga, papa, tabaco, etc. Si bien no se ha comprobado que produzca toxinas en girasol las semillas contaminadas con esclerocios no pueden ser consumidas ni por animales ni por el hombre y llevan la infección a nuevos campos al sembrarlas. El laboreo y las máquinas también pueden llevar esclerocios a campos sin infección (Gulya et al, 1997).

En nuestro país la podredumbre del capítulo es de suma importancia en la zona sudeste y sur de la provincia de Buenos Aires. Mientras que el ataque en raíz y base del tallo es más importante en el norte de la provincia (Pereyra y Bazzalo, 1988).

El ataque sobre capítulo ha sido un gran problema en los años 80 (Pereyra y Bazzalo, 1991). De hecho, en los años 87/88 hubo una reducción del 50% en el rendimiento, con una pérdida total de 50.000 Ha. La siembra de girasol ha disminuido en la zona de mayor ataque que es la banda costera del SE de Bs As y la zona serrana (Pereyra y Bazzalo, 1991).

La podredumbre de la zona media del tallo, el ataque al “botón floral” y la podredumbre de hojas jóvenes, también causadas por *S. sclerotiorum* no revisten demasiada importancia en Argentina (Pereyra & Bazzalo, 1991).

Otra especie perteneciente al mismo género, *S. minor* también ataca girasol produciendo podredumbre de raíz y marchitamiento en Australia, Argentina, Uruguay, Chile y en EE.UU.-California- (Gulya et al, 1997).

#### PLANTA HOSPEDANTE:

El girasol pertenece al orden Campanulales, familia Compositae , subfamilia Tubiflorae, tribu Helianthae, género *Helianthus* Heiser (1969) agrupa 68 especies dentro de este género.

Se utiliza la capacidad de hibridarse fácilmente de *H. annuus*, produciendo híbridos artificiales con diversas especies perennes. Entre ellos puede mencionarse *H.*

*tuberosus* que es un hexaploide que exhibe tolerancia a *S. sclerotiorum* (Orellana, 1975).

*H. annuus* es una especie anual, que posee crecimiento primario y secundario tanto en raíz como en tallo (Carter, 1978).

La inflorescencia se caracteriza porque la floración se produce en forma centripeta espiralada.

Sus flores atraviesan por tres estados fenológicos, el primero se produce al abrirse la corola, en el segundo se proyectan las anteras y sobrepasan la longitud de la corola debido al aumento de la turgencia de las células basales de los filamentos; y en el tercero éstas células pierden turgencia y las anteras descienden quedando expuesto el estigma (Lamarque, 1984).

#### AGENTE CAUSAL:

##### Taxonomía:

*Sclerotinia sclerotiorum* pertenece a la clase Ascomycetes, subclase Euascomycetes, serie Discomycetes, dentro del orden Helotiales familia Sclerotiniaceae (Kohn, 1979(a); Zimmer y Hoes, 1978), constituida de acuerdo con Whetzel (1945) por discomicetes inoperculados productores de estromas, apotecios estipitados, ascosporas elipsoidales y espermacios globosos.

El género *Sclerotinia* fue designado como el género tipo de la familia. Si bien en algún momento se consideraron sinónimos *S. sclerotiorum* y *S. minor*, con la revisión de las especies con importancia económica hecha por Kohn (1979 (a)) se redujo a sólo 3 el número de especies: *S. sclerotiorum*, *S. minor* y *S. triflorum*. Las tres especies se diferencian por las características morfológicas y anatómicas de sus estructuras de resistencia o esclerocios y por la morfología de los apotecios y ascosporas.

##### Biología del patógeno:

Todas las especies de *Sclerotinia* poseen un estado asexual caracterizado por la

producción de micelio y esclerocios y un estado sexual con formación de apotecios portadores de ascos y ascosporas (Khon, 1979 a). En particular *S. sclerotiorum* posee una relación largo/ancho de las ascosporas mayor que 2 y son binucleadas. Posee micelio tabicado de color blanco. Como en otros géneros de la familia, *Sclerotinia* produce microconidios hialinos y globosos producidos superficialmente sobre el micelio aéreo en el cultivo, sobre la superficie de los apotecios o sobre la superficie de los esclerocios (Khon, 1979 b).

Su esclerocio es generalmente grande y con forma irregular, algunos pueden medir entre 1 y 5 cm. Cuando el patógeno ataca el capítulo, sus esclerocios pueden asemejarse mucho a las semillas, tanto en forma como en tamaño.

La formación del esclerocio involucra la acumulación de hifas que forman una masa suave de color blanco; que luego de la maduración, pasa a ser una masa compacta y dura como consecuencia de la melanización de la capa más externa (Jones, 1970). Están constituidos por una corteza de hifas de paredes melanizadas, oscuras y muy engrosadas y una médula parenquimática laxa de elementos globosos (Lamarque, 1976).

Cuando se está formando el esclerocio el espacio intercelular se llena de un líquido que es continuo con las gotas de la superficie (Colotelo, 1974). Una vez que está maduro, la pared original quitinosa de las hifas internas se cubre con una delgada capa fibrilar. La pared melanizada posee tres células de espesor y la médula de tejido prosenquimático está embebida en la matriz fibrilar. A la madurez consta de una corteza de aproximadamente tres células de espesor y una médula con tejido prosenquimático embebido en la matriz fibrilar (Colotelo, 1974; Saito, 1974).

Una vez formado el esclerocio puede permanecer viable varios años (Le Tourneau, 1979). De hecho poseen una viabilidad que puede llegar hasta 5 años; ésto depende en general de su tamaño y estado nutritivo, de los factores ambientales y de la posible presencia de antagonistas o hiperparásitos del hongo (Gulya et al, 1997).

A partir de los esclerocios puede producirse la infección del hospedante; ya sea dando origen a micelio (germinación miceliogénica) que infecta directamente las raíces y base del tallo del girasol produciendo marchitamiento (Huang y Dueck, 1980; Huang y Hoes, 1980) o bien formar apotecios (germinación carpogénica) que darán ascos y ascosporas, que podrán infectar las partes aéreas causando podredumbre del tallo y del

capítulo (Le Torneau, 1979).

Se cree que puede haber germinación carpogénica a partir de los esclerocios sólo después de someterlos a un período de dormición en condiciones de humedad y temperaturas aún no bien determinadas. Los factores ambientales que afectan la incidencia y el desarrollo de la enfermedad así como la epidemiología de estos dos tipos de infecciones pueden ser muy diferentes (Abawi y Grogan, 1974).

Se ha observado que la germinación del esclerocio depende del grado de melanización, que es modificado por las condiciones ambientales durante la formación, el lugar donde quedaron ubicados y la época del año (Pereyra y Bazzalo, 1991). Aspectos relacionados con la formación y germinación de esta estructura pueden encontrarse en trabajos de Chet y Henis (1975) y Willets (1978).

Algunos autores consideran que bajo condiciones de baja humedad se produce el ataque por crecimiento de micelio infectando tallos jóvenes directamente.

Los eventos relacionados con la producción de apotecios han sido estudiados a través de microscopio de luz transmitida y microscopio electrónico con test histoquímicos (Steadman & Nickerson, 1975; Kosasih & Willets, 1975; Saito, 1973).

Los apotecios tienen forma de taza, usualmente marrón claro, miden entre 2 y 10 mm de diámetro y se sostienen por un pie que emerge directamente del esclerocio. Un solo esclerocio puede producir hasta 8 apotecios. Los estípites son fototrópicos y no hay diferenciación del disco superior si no recibe luz (De Bary, 1887). Los ascos son cilíndricos y miden entre 90 y 160 µm de largo y entre 6 y 10 µm de ancho (Gulya et al, 1997).

Una vez maduro, el estípite consta de una capa externa de hifas comprimidas y una médula de hifas septadas alargadas y ramificadas. El disco posee un excípulo externo, un excípulo medular, el himenio y el subhimenio (Kosasih & Willets, 1975 ).

Después de la diferenciación el asco contiene 8 ascosporas (Kosasih & Willets, 1975) que se descargan violentamente. Pueden ser transportadas por corrientes de aire hasta varios kilómetros (Holtzhausen y Van der Westhuisen, 1980), por insectos o bien por el salpicado de las gotas de lluvia (Gulya et al, 1997). Las esporas son hialinas, elipsoides, a veces achatadas (Kohn, 1979(b)). La producción de apotecios, de esporas y la descarga de estas últimas ocurre entre los 4°C y 32°C; pero la temperatura

óptima para la germinación de las esporas e infección en girasol es entre 20°C y 25°C. Con baja humedad y temperaturas entre 19°C y 24°C las ascosporas permanecen viables por más de 5 días, mientras que a 5°C pueden germinar muchos meses después (Gulya et al, 1997)

La germinación miceliogénica de un esclerocito da origen a hifas ( Abawi et al, 1975) que crecen atravesando la pared del esclerocito. En algunos casos se ha podido observar que este micelio puede originar también nuevos esclerocitos, más pequeños conocidos como esclerocitos secundarios (Steadman y Nickerson, 1975).

## CONDICIONES PARA LA INFECCIÓN Y SINTOMATOLOGÍA:

### Podredumbre de raíz y marchitamiento:

La germinación miceliogénica se ve favorecida por los exudados de las raíces. El micelio de *S. sclerotiorum* crece mejor con temperaturas entre 20 y 25°C (Gulya et al, 1997) y puede extenderse de 5 a 30 mm del esclerocito; pero es infectivo sólo al ponerse en contacto con el hospedante (Williams & Western, 1965 Gulya et al, 1997). El micelio infectivo penetra directamente las raíces e hipocótille, invadiendo rápidamente los tejidos. Generalmente se inicia en las raíces secundarias y por contactos de raíces infectadas con raíces de plantas sanas (Hoes & Huang, 1976); pero también se ha observado que el hongo puede invadir en forma indiscriminada todas las raíces, tanto principales como secundarias y en cualquier sitio. La infección primaria se da al azar cuando las raíces en crecimiento activo se ponen en contacto con el micelio (Gulya et al, 1997). Se ha observado que se ve favorecida en presencia de materia orgánica muerta (Pereyra & Bazzalo, 1991).

El marchitamiento aparece en cualquier momento entre la emergencia y la madurez del hospedante (Gulya et al, 1997); pero prevalece en la floración, cuando el sistema radicular ha alcanzado su máxima extensión y comienza la senescencia.

El marchitamiento súbito es el primer síntoma de la planta infectada; ya que es la consecuencia de que las raíces no absorben agua en forma eficiente para abastecer las

demandas de la planta. Tanto en el tallo como en la raíz aparecen manchas cast año claro de aspecto húmedo y lesiones de consistencia blanda.

A partir del sitio de entrada crece en forma tanto ascendente como descendente, descompone el tejido parenquimático y consume la corteza provocando la podredumbre de la raíz y el marchitamiento de la planta. Se desarrolla micelio blanquecino sobre el tallo en condiciones de alta humedad (Holtzhausen y Van der Westhuisen, 1980).

Las plantas con una infección leve o tardía muestran lesiones marrones y micelio *blanco* en el área basal del tallo; pero no muestran marchitamiento permanente. Los esclerocios se producen en alrededor de 10 días se originan en la superficie de la raíz, la porción basal del tallo y dentro de la médula en las áreas infectadas. Estas lesiones pueden extenderse hacia arriba alcanzando de 10cm a 20cm de largo (Gulya et al, 1997) dependiendo de la susceptibilidad del hospedante, las condiciones ambientales y la virulencia del patógeno (Bazzalo, 1986).

Si bien en ocasiones se ha determinado que existe una alta incidencia de la enfermedad en poblaciones con alta densidad de siembra y que la baja densidad disminuye la propagación de la enfermedad. Otros autores observaron que altas densidades de plantas no tuvieron efecto directo sobre la incidencia de la enfermedad en girasol (Gulya et al, 1997).

#### Ataque de yemas terminales:

Se ha observado que el patógeno puede atacar también las hojas (Cuk, 1978) y las yemas terminales (Peres et al, 1989). Se identificó por primera vez en Francia en el año 1980 (Tourvielle et al, 1992) y también causa importantes pérdidas económicas.

La infección se inicia a partir de las ascosporas que se depositan en las hojas jóvenes alrededor de las yemas que se decoloran y muestran manchas necróticas. Bajo condiciones de alta humedad puede llegar al pecíolo y al tallo. De acuerdo con las últimas investigaciones, la producción de un exudado en la base de las hojas maduras favorecería la infección en esa zona (Sedun & Brown, 1987).

### Podredumbre de la zona media del vástago:

Esta enfermedad no está tan difundida en la Argentina (Pereyra & Bazzalo, 1991). La infección se inicia luego de la germinación carpogénica de los esclerocios del suelo cuando las ascosporas de *S. sclerotiorum* son liberadas.

Puede ocurrir en cualquier momento del ciclo de vida de la planta, dependiendo de la presencia de ascosporas y de las condiciones favorables para la infección. En general se produce entre la floración y la madurez. La lesión es similar a la de la base del tallo y también se ve degradación de la médula y formación de esclerocios. Generalmente no causa marchitamiento completo ni la muerte de las plantas, pero sí provoca la rotura del tallo en el punto de infección causando pérdidas totales en la producción (Gulya et al, 1997).

### Podredumbre del capítulo:

La infección se inicia cuando los esclerocios presentes en la superficie del suelo o a escasa profundidad, germinan produciendo apotecios. Este proceso se favorece con alta humedad relativa y baja temperatura -óptimamente 10°C- (Holtzhausen & Van der Westhuisen, 1980). Los cuerpos fructíferos producen las ascosporas que son llevadas por el viento y se depositan sobre las distintas partes de las flores, es necesario luego días de lluvia o alta humedad relativa y bajas temperaturas. La germinación da lugar a micelio que invade las piezas florales (Pereyra & Bazzalo, 1991). De acuerdo con investigaciones hechas en EE.UU. las ascosporas pueden sobrevivir en condiciones secas y desfavorables (tales como HR del 50%) y germinar cuando se den las condiciones favorables (Holtzhausen & Van der Westhuisen, 1980).

Se ha observado que la germinación de las ascosporas en girasol requiere de agua libre y una fuente de energía exógena (Abawi & Grogan, 1975; Gulya et al, 1997) ésto se asocia con la presencia de glándulas productoras de sacarosa en las hojas, peciolos, tallos y capítulos, que le otorgarían nutrientes esenciales para la germinación y la infección

(Gulya et al, 1997).

En la época de la floración el polen muerto y el néctar junto con la presencia de agua permite el desarrollo de hifas infectivas a partir de las ascosporas (Says Lesage & Tourvielle, 1988). Además, como otros patógenos infecta más fácilmente en tejido herido o con presencia de materia orgánica en descomposición. Los pájaros o insectos que visitan las flores causan heridas de diversa magnitud y permiten la salida de los fluidos intercelulares favoreciendo la infección; y son ellos los que pueden difundir la enfermedad llevando micelio de plantas infectadas a plantas sanas (Gulya et al, 1997).

Si las condiciones que siguen a la infección son de baja humedad ambiente el hongo se desarrolla lentamente, lo que le permite a las semillas alcanzar la madurez con menores pérdidas en la producción. Si por el contrario las condiciones son de alta humedad relativa y temperaturas moderadas a frescas, el desarrollo del hongo se ve favorecido, y en este caso se pueden ver los primeros síntomas de podredumbre en los capítulos cuando se aproxima el estado de madurez fisiológica del cultivo (Pereyra & Bazzalo, 1991).

Normalmente las hifas penetran por la parte superior de la inflorescencia y las manchas características se manifiestan en el receptáculo. Éstos incluyen áreas levemente hundidas, marrón claro y de consistencia blanda que rápidamente aumentan de tamaño, invadiendo todo el capítulo, destruyendo los tejidos y provocando la caída de los granos o de toda la inflorescencia (Pereyra & Bazzalo, 1991; Holtzhausen y Van der Westhuisen, 1980). Se produce la destrucción de la capa epidérmica y se exponen los haces vasculares. Eventualmente sólo los haces vasculares deshilachados con algunos esclerocios adheridos a ellos permanecen en el tallo marchito (Holtzhausen y Van der Westhuisen, 1980).

El producto final del ataque lo constituyen los esclerocios, la mayoría de ellos caen nuevamente al suelo y permiten así que se reinicie el ciclo.

Otros hongos también atacan el capítulo de girasol causándole enfermedades, éste es el caso de especies de los géneros *Rhizopus*, *Alternaria* o *Botrytis*; pero las manchas color té con leche clara, donde el dedo puede hundirse con facilidad son síntomas típicos de la presencia de *Sclerotinia sp.* (Pereyra & Bazzalo, 1991). Además puede observarse abundante micelio blanco algodonoso sobre las flores atacadas.

La enfermedad se produce cuando coinciden presencia de esporas, cultivos en plena floración y una película de agua sobre el capítulo, durante por lo menos dos días. En los años de lluvias normales muy pocos cultivos cumplen con estas tres condiciones; pero aquellos años con lluvias frecuentes gran cantidad de cultivos pueden alcanzarlas (Pereyra & Bazzalo, 1991).

Se ha podido concluir que los factores ambientales y, especialmente la humedad y el estado de desarrollo del capítulo, son los que predisponen a la planta para la enfermedad en el momento de la infección. Este hecho impide la comparación del comportamiento de distintos genotipos que no hayan florecido simultáneamente y en el mismo lugar (Tourvielle & Vear, 1986).

#### HISTOPATOLOGÍA DEL ATAQUE:

La capacidad invasiva de *Sclerotinia* y el modo de penetración en el tejido hospedante depende del tipo de inóculo, estado nutritivo del hongo, las propiedades del hospedante y el efecto de las condiciones ambientales (Lumsden, 1979).

De acuerdo con De Bary (1887) las ascosporas constituyen la fuente primaria de inóculo. Éstas al germinar producen un apresorio simple capaz de penetrar al hospedante (Abawi et al, 1975; Purdy, 1958).

Las ascosporas requieren de nutrientes externos para penetrar al hospedante (De Bary (1886 y 1887)), en presencia de agua germinan, pero las hifas no son capaces de formar apresorios sobre el hospedante y luego penetrarlo (Lumsden, 1979).

Si bien se ha visto que *S. sclerotiorum* puede penetrar a través de estomas abiertos sobre hojas de papa (Jones, 1976) en la mayoría de los hospedantes se produce a través de la cutícula (Abawi et al, 1975; Boyle, 1921; Lumsden & Dow, 1973; Prior & Owen, 1964; Purdy, 1958).

La infección se inicia con la formación de apresorios que son estructuras complejas, mucilaginosas en forma de copa, ese material mucilaginoso oscurece el tejido que lo rodea (Lumsden & Dow, 1973; Prior & Owen, 1964). La presencia de éstos

exudados secretados por las esporas estaría involucrada con un fenómeno de reconocimiento entre el hongo y su hospedante. Este material y la forma de domo parecen permitir el ingreso del patógeno en forma mecánica (Abawi et al, 1975; Boyle, 1921 y Lumsden & Dow, 1973). Este hecho está apoyado por evidencias tales como: la ausencia de ablandamiento, disolución y cualquier modificación de la cutícula previo a la penetración (Boyle, 1921). En cambio Prior y Owen (1964) observaron desintegración de la cutícula y las células epidérmicas como resultado de la acción enzimática en hojas de trébol.

Después de la penetración de la cutícula del hospedante se desarrolla una vesícula granular entre la cutícula y la epidermis (Boyle, 1921; Lumsden & Dow, 1973; Purdy, 1958). Las hifas infectivas invaden el tejido del hospedante y crecen intra, intercelularmente (Abawi et al, 1975 y Purdy, 1958) o en ambas formas (De Bary, 1887). En girasol, las hifas de *S. sclerotiorum* causan cambios en los tejidos por alteración y destrucción de los materiales pecticos de las laminillas medias de las células. Esto ocurre antes del arribo de las hifas de avance (Lumsden, 1979). Despues de que se da la colonización extensiva de los tejidos se observa la emergencia de las hifas desde el tejido hospedante (Lumsden & Dow, 1973; Jones, 1976 y Abawi et al, 1975) y por último se forman los esclerocios.

#### BIOQUÍMICA DEL ATAQUE:

El desarrollo de la enfermedad, involucra la acción de enzimas que degradan la pared celular, enzimas capaces de destruir los compuestos celulares y la producción de ácido oxálico.

Las sustancias pecticas son los principales componentes de la laminilla media, el “cemento” intercelular que mantiene unidas las células. También constituyen una gran parte de la pared celular primaria, formando un gel amorfo que llena los espacios entre las microfibrillas de celulosa. Son polisacáridos formados mayormente por cadenas de moléculas de ácido galacturónico entre los que se encuentran intercalados algunos

residuos de ramnosas y cortas cadenas laterales de ácido galacturónico y otros azúcares (Agrios, 1988).

Las enzimas pectinolíticas producidas por *S. sclerotiorum* separan los grupos metoxilo de la pectina y disuelven la laminilla media de las células de la planta (Echandi y Walker, 1957). Estas enzimas parecen estar reguladas por inducción autocatalítica. El producto formado por ellas provee de nutrientes al patógeno en el tejido infectado y se cree que son los subproductos de su acción catalítica los que están involucrados en la producción de las oclusiones y tapones del tejido vascular que conducen al marchitamiento (Agrios, 1988).

Como consecuencia de la acción de las enzimas pectinolíticas hay una maceración del tejido de la planta atacada, éste sirve de sustrato para el crecimiento de las hifas, dando lugar a una pudrición blanda y permite el crecimiento intercelular del patógeno (Bazzalo, 1986). La muerte de las células se produce ocasionada por el ablandamiento y los cambios osmóticos que provocan estas enzimas (Agrios, 1988).

Si bien en algunos de los casos la patogénesis de *Sclerotinia spp* se ha asociado a las celulosas y hemicelulosas (Barkai-Golan, 1974; Calonge et al, 1969 y Newton, 1972) el rol de las mismas no está claro. También se detectó en tejido enfermo de girasol la actividad de enzimas arabanasas, galactanasas y xilananasas (Bazzalo, 1986). También se detectó actividad proteolítica responsable de la degradación del protoplasma hospedante y de los constituyentes de la pared celular en cultivos de *S. sclerotiorum* y *S. minor* (Khare y Bompeix, 1976) y en tejido infectado (Khare y Bompeix, 1976 y Newton, 1972).

Lumsden (1970) estudió fosfatidasas del patógeno, tanto en cultivo, como en plantas de poroto infectado, que degradarían los fosfátidos de las membranas celulares (Bazzalo, 1986).

En la infección causada por *Sclerotinia sp*, de Bary (1886) asoció la presencia del hongo con el ácido oxálico. Éste actúa como una toxina móvil que se acumula en el follaje, produciendo la marchitez, alterando el pH y el equilibrio hídrico, induciendo a la pérdida de agua por parte de las células de la planta (De Bary, 1886; Hancock, 1972(b); Overell, 1952 y Brown 1936), también puede adjudicarse otras propiedades como la de quedar sus propiedades de quedar cationes (entre ellos el Ca), sustrayéndolos de los

pectatos y permitiendo la acción de las poligalacturonasas (Maxwell y Lumsen, 1970 y Bateman y Beer, 1965).

## FORMAS DE RESISTENCIA ANTE EL ATAQUE DE UN PATÓGENO:

Se entiende por resistencia a la enfermedad las condiciones en que las plantas, al ser atacadas por un patógeno, sufren un daño pequeño o no sufren daño. Involucra por un lado la resistencia a la penetración y por otro la resistencia al desarrollo y dispersión de la enfermedad (Kamamura y Ono, 1948). Éstos mecanismos comprenden tanto barreras físicas, como químicas y fisiológicas.

La primera incluye toda estructura que se oponga a la entrada del patógeno mientras que la otra es controlada principalmente por actividad plasmática de la célula - resistencia funcional- (Tochiani, 1951). Una barrera a la penetración, se llama también mecanismo pasivo preinfeccional o constitutivo. La actividad desempeñada por la célula para impedir la propagación de la enfermedad constituye una forma de defensa plasmática (Akai, 1959) y aparece en los tejidos después del inicio de la infección (Gäuman, 1950), como respuesta a la invasión. También se lo llama mecanismo posinfeccional o inducido (Horsfall y Dimond, 1959).

### -Barreras a la penetración:

Dentro de las estructuras superficiales que actúan como barrera de penetración se incluyen las diversas coberturas. Usualmente se trata de cutícula y epidermis. A veces la epidermis posee una capa de ceras que varían en cantidad y calidad. Sus paredes celulares pueden tener suberina o lignina que actúan como barrera para la penetración (Akai, 1959). También se incluyen dentro de ellas el tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas (Agrios, 1988).

Las ceras y los pelos constituyen formas indirectas en la resistencia a la penetración, aunque no siempre la dificultan. Las ceras sobre hojas y frutos actúan como repelente del agua en la que el patógeno podría depositarse y germinar.

Los pelos, que se encuentran en la superficie pueden ejercer un efecto similar

(Agrios, 1988). De acuerdo a lo observado por Jamaux et al (1995) en la superficie de las hojas de *Brassica sp*. donde no se vió ataque, el espesor de la cutícula parece actuar como una barrera contra la penetración, ésta propiedad sería provista por la cutina (Koler, 1991). Las ceras epicuticulares pueden impedir la adhesión y “enmascarar” los sitios de reconocimiento. Existen algunas citas acerca de las posibles propiedades antifúngicas de las ceras epicuticulares (Blakeman & Sztejnberg, 1973). Otras veces es importante el ancho y el espesor de la pared celular. Esto se vió en especies de *Berberis sp* frente al ataque de *Puccinia* que causa “herrumbre negra”. La hojas de la especies no susceptibles poseen mayor espesor de la pared externa de la epidermis y de la cutícula que las altamente susceptibles frente a las altamente susceptibles (Melander & Craigie, 1927). Pero no siempre el grosor de la cutícula está correlacionada con la resistencia. Agrios (1988) encontró ciertas variedades de lino resistentes a pesar de tener células epidérmicas con cutícula delgada, pero las células de la epidermis eran en estos casos isodiamétricas con epidermis de paredes engrosadas (Sarvelle, 1936). En cultivo de arroz el ataque por *Piricularia oryzae* se produce directamente a través de las células epidérmicas, ocurre con mayor frecuencia a través de las células motoras del estoma debido a que éstas tardan más tiempo en significarse que las restantes células de la epidermis (Yoshii, 1936).

#### -Barreras al desarrollo:

En la mayoría de las enfermedades no sistémicas de las plantas la infección permanece localizada dando origen a los síntomas característicos (Akai, 1959). Esto prueba la existencia de una reacción de defensa antiparasítica autónoma que puede ser histogénica o de defensa metabólica.

Las reacciones de defensa histogénica incluyen:

##### 1) Barreras físicas preinfeccionales:

a) presencia de elementos lignificados y suberificados con diferencias en la abundancia y distribución , b) el grado de lignificación y suberificación de las células y c) la proporción de pectatos de Ca insolubles en la laminilla media y pared celular (Akai y Fukutomi, 1980), d) por formación de una capa de cicatrización, dada por células de absisión, tilosis, deposición de gomas o capas de corcho (Akai, 1959) y e) la presencia de áreas de

células de esclerénquima ( Agrios, 1988), que delimitan la zona infectada.

2) Barreras físicas postinfeccionales:

a) acumulación de Ca en la pared y laminilla media; b)la síntesis y deposición de nuevo material de pared o de otros carbohidratos, c) la formación de papillas, tilosis y geles vasculares, la lignificación, etc (Beckman, 1980; Bell, 1981).

Las reacciones de defensa plasmática (barreras químicas o de defensa metabólica), puede ser dividida en:

1) defensa metabólica preexistente:

- a) inhibidores liberados al medio: algunos compuestos suelen tener efecto antagonista contra los patógenos.
- b) carencia de reconocimiento entre hospedante y patógeno: ciertas especies o variedades, carecen en su superficie de factores de reconocimiento y por lo tanto no son atacadas.
- c) carencia de receptores y otros sitios de reconocimiento en el hospedante para las toxinas responsables de la sintomatología.
- d) carencia de nutrientes esenciales para el patógeno: ciertas especies o variedades por alguna razón no producen sustancias esenciales para la supervivencia de un patógeno o para el desarrollo de la enfermedad.
- e) inhibidores presentes en las células antes de producirse la infección: dado por compuestos fenólicos y taninos presentes en altas concentraciones en células jóvenes. Muchos son potentes inhibidores de enzimas hidrolíticas . Otras veces se trata de proteínas o de enzimas hidrolíticas contenidas en el tejido hospedante, tales como glucanasas y quitinasas ( Agrios, 1988). También se incluyen lactonas no saturadas, saponinas, aceites, poliacetilenos, estilbenos, terpenos, etc (Schönbeck y Schlösser, 1976; Overeem, 1976).

2) defensa metabólica inducida por el ataque del patógeno:

Involucran la producción de sustancias fungitóxicas alrededor del sitio dañado. Algunos están en suficiente concentración como para inhibir el crecimiento de la mayoría de los hongos y bacterias. Son compuestos fenólicos como el ácido clorogénico y caféico, productos de oxidación de compuestos fenólicos y también fitoalexinas ( Agrios, 1988).

La reacción necrótica se produce tan pronto como el patógeno penetra la célula. Se desencadenan una serie de procesos que determinan la degeneración de las hifas y muerte de las células vegetales. Cuanto más rápido se da el proceso más resistente a la enfermedad será la célula hospedante ( Agrios, 1988).

Se da en combinaciones incompatibles de planta hospedante y patógeno. La penetración de la epidermis es la misma en plantas resistentes y susceptibles. Después de la infección las células en variedades resistentes pierden turgencia rápidamente, se tornan castañas y mueren, mientras que en las variedades susceptibles sobrevive considerablemente más tiempo. Hay cambios fisiológicos muy importantes en las células de las variedades resistentes que incluyen la pérdida de permeabilidad de la membrana celular, el aumento de la respiración, la acumulación y oxidación de compuestos fenólicos y producción de fitoalexinas. Así el patógeno queda aislado por tejido necrótico y rápidamente muere.( Agrios, 1988).

#### ANTECEDENTES DE ESTUDIOS ANATÓMICOS, MORFOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL ATAQUE DEL PATÓGENO SOBRE GIRASOL:

Lumsden (1979) propone tres tipos generales de mecanismos en los diversos hospedantes frente a distintas especies de *Sclerotinia sp*: 1)anatómicos (resistencia del tejido a la degradación); 2) compuestos antifúngicos preformados y 3) compuestos antifúngicos posinfeccionales.

En el caso del girasol se ha observado que existe un amplio rango de susceptibilidad (Dueck & Campbell, 1978). , que varía con la edad de la planta en el momento de la infección (Auger y Nome, 1970; -Bazzalo 1982-a-). Bazzalo (1982-a-) observó que plantas en estado vegetativo o con yemas florales abiertas fueron más susceptibles al ataque en tallo que aquellas portadoras de yemas florales cerradas. Éstas diferencias estarían dadas por la velocidad de crecimiento del hongo dentro del hospedante.

Se ha podido observar que la frecuencia de aparición de enfermedades en capítulo tiene relación directa con la inclinación de la inflorescencia. En aquellos genotipos que presentan un grado de curvatura elevado del tallo, el capítulo se coloca

más cercano al follaje y ésto crea un medio ambiente favorable para el desarrollo intensivo de las enfermedades (Seiler, 1997).

A través de estudios anatómicos y morfológicos se han podido establecer en parte, los procesos involucrados en la infección por *S. sclerotiorum* sobre girasol.

En particular en el caso de la infección en capítulo hay estudios que han empleado la técnica de microscopía electrónica de barrido, para determinar el mecanismo y los sitios de entrada (Lamarque et al, 1985). Éste y otros trabajos previos han considerado que la floración es el estado de mayor sensibilidad del girasol al ataque del capítulo por *S. sclerotiorum*. Says-Lesage y Tourvieille (1988) estudiaron el ataque en tres estadios fenológicos de las flores. De ellos concluyeron que el estado más susceptible es el que se encuentra entre la apertura de las flores y la producción de polen.

Lamarque et al (1985) han logrado establecer que los elementos de cutícula y la presencia de pelos pueden jugar un rol desfavorable sobre la germinación de las ascosporas. Según Grogan y Abawi (1975) la supervivencia de las mismas depende de fuentes nutritivas disponibles en el medio. Por otro lado se considera que la forma y complejidad del apresorio se relaciona con la dificultad de penetrar en determinado órgano (Tariq y Jeffries, 1984). Ellos han sugerido que *S. sclerotiorum* podría penetrar superficies blandas sin la presencia de apresorios.

En los estambres se produce una mayor germinación de las esporas pero el micelio no logra penetrarlos (Lamarque et al, 1985). Sin embargo Says-Lesage y Tourvieille (1988) observaron que, con alta humedad relativa, los estambres no sólo tenían mayores índices de germinación sino también mayor penetración de ambas superficies. En corola y en pistilo, si bien se ha observado germinación no han podido detectar penetración. Con baja HR sólo vieron germinación en las piezas florales, si había polen presente (Says-Lesage y Tourvieille, 1988).

Se han propuesto dos vías posibles de ataque del parénquima lacunar del receptáculo: 1) a través de la bráctea interna del receptáculo y 2) a través del ovario (Lamarque et al, 1985). Éstos mismos investigadores han observado que el ovario es susceptible sólo cuando es joven, al ataque por hifas provenientes de otras piezas florales. Las brácteas internas son difíciles de penetrar y se forman ampollas en los tubos germinativos de las ascosporas. Por lo tanto consideraron que ésta podría ser la causa del

largo período entre la inoculación y la aparición de los primeros síntomas, cuando la infección se inicia por bráctea.

En ciertas variedades “silvestres” de girasol, la presencia de tricomas glandulares en las anteras se han asociado con la resistencia a insectos en diferentes cultivos (Baker, 1990; Gershenson et al, 1985) ya que impiden la predación del polen. Éstos tricomas están relacionados con la producción de terpenos que son además antifúngicos y podrían tener algún papel en la defensa contra ataque de hongos patógenos, tal como *S. Sclerotiorum* (Spring & Bienert, 1987)

Además existe una relación bioquímica entre la susceptibilidad y la edad de la planta (-Bazzalo, 1982 (b)) dado que los compuestos fenólicos se acumulan en forma abundante cuando la planta resulta resistente al ataque del patógeno (Pridman 1960; Kuc 1964; Kosuge 1969; Byrde y Cutting 1973 y Friend 1977 ). Muchos de éstos compuestos y sus productos de oxidación son tóxicos tanto para hongos como para bacterias patógenas.

De acuerdo con estudios hechos por Bazzalo et al (1985) en el ataque de tallo; los compuestos fenólicos pueden estar relacionados al mecanismo de resistencia en girasol. Se pudo detectar un significativo incremento en los fenoles totales en plantas inoculadas frente a plantas control como respuesta al ataque de *S.sclerotiorum*.

A su vez se observó que las plantas control de diferentes edades tenían también distintas cantidades de estos compuestos; encontrándose en menor cantidad cuando las yemas florales estaban abiertas. En las plantas susceptibles la cantidad es menor que en plantas tolerantes.

El incremento en los fenoles preformados y la aparición de algunos nuevos, sugieren que tendría lugar una alteración en el camino de biosíntesis. Por otra parte la susceptibilidad o tolerancia pueden no residir en la capacidad de síntesis de ciertos compuestos inhibitorios, sino en la velocidad para sintetizarlos o bien en la velocidad del patógeno para metabolizarlos (Cruickshank 1963; Kuc, 1976; Bell, 1981).

## FORMAS DE CONTROL:

### -Control de las enfermedades causadas por especies del género *Sclerotinia*:

La patogenicidad explosiva de *S. sclerotiorum*, *S. minor* y *S. trifoliorum* bajo condiciones favorables y la capacidad de supervivencia de sus esclerocios, les permite atacar muchos cultivos. Los métodos de control pueden incluir: protectores químicos, materiales que inhiben la germinación o destruyen el esclerocio y prácticas culturales tales como la rotación de cultivos, saneamiento, irrigación reducida, etc. Otros menos empleados son: parásitos de esclerocios, cultivares resistentes o tolerantes y modificación del microclima.

En general los métodos de control de las enfermedades causadas por *Sclerotinia sp* dependen del cultivo. En algunos casos el control químico puede ser efectivo; sin embargo, el alto costo y el desarrollo de cepas fungicida-resistentes del patógeno, indican que las prácticas culturales o la resistencia deberían ser investigados.

La modificación de las prácticas culturales puede reducir la enfermedad en la mayoría de los cultivos; pero frecuentemente no son compatibles con la alta producción de semillas (Pereyra et al, 1991).

### -Control de las enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* sobre girasol:

En particular, el control de la podredumbre del capítulo de girasol causada por *S. sclerotiorum* es problemático debido a varios factores entre los que se destacan la formación de esclerocios y su permanencia en el suelo con capacidad infectiva por un importante número de años (Adams y Ayers, 1979); la ineficacia del control químico (Peres et al, 1986) y la falta de información acerca del comportamiento de los híbridos y variedades ofrecidos para la siembra. Por otra parte, es importante tener en cuenta el efecto que tienen los factores ambientales (en especial la humedad) y el estado de desarrollo del capítulo en el momento de la infección (Tourville y Vear, 1986).

### -Control químico:

Se han ensayado fungicidas que inhiben la germinación de los esclerocios; pero sin buenos resultados. Sin embargo cuando los fungicidas, tales como bromuro de metilo

y de formaldehido, se aplican antes de la siembra, se logran destruir los esclerocios del suelo (Alabouvette y Louvet, 1973).

-Prácticas culturales:

a) siembra de cultivos susceptibles solamente en suelos bien drenados, colocando las plantas no demasiado cerca unas de otras para favorecer el secado por aire y conservar el suelo libre de malezas entre cultivos.

b) alternancia de cultivos hospedantes con no hospedantes, en el caso de *S. sclerotiorum*, debido al amplio rango de hospedantes, ésta práctica parece no ser una buena alternativa para el control. Los trabajos de arado de la tierra aseguran la reaparición de los esclerocios sobre la superficie del suelo de un ciclo de cultivo al otro. Teniendo en cuenta la viabilidad de los esclerocios resulta útil alternar los cultivos susceptibles con cultivos no susceptibles tales como maíz durante la cantidad de años necesaria para la pérdida de viabilidad, antes de sembrar nuevamente el cultivo capaz de ser atacado por *Sclerotinia sp.* (Agrios, 1988).

La rotación puede ser más efectiva contra la infección causada por los esclerocios (base del tallo, hoja, etc) que contra la infección sobre capítulo causada por ascosporas (Steadman, 1979).

c) otra práctica frecuente ha sido, eliminar las plantas, quemarlas y remover del campo la mayor cantidad posible de esclerocios

-Control genético:

La resistencia genética de *S.sclerotiorum* fue observada por primera vez por Anton de Bary en 1887 cuando encontró que *Phaseolus multiflorus* (*P.coccineus*) era menos atacado que *P.vulgaris*.

Se han encontrado en muchos sistemas hospedante-patógeno genes que otorgan resistencia. En girasol se han citado diferencias de susceptibilidad entre los distintos cultivares (Gulya et al, 1989; Pereyra y Bazzalo, 1991). Ha habido una intensa búsqueda de genes que otorguen resistencia contra *S. sclerotiorum*. Pero no se ha encontrado inmunidad absoluta en girasoles cultivados.

Sin embargo, se han citado diferentes genotipos de girasol con baja susceptibilidad o marcada resistencia ya desde 1950. En otros casos se ha informado de híbridos con baja frecuencia de marchitamiento. Se observó que estos híbridos no eran

los mismos que tenían baja frecuencia de ataque en capítulo, lo que indicaría que hay diferentes factores genéticos involucrados (Gulya et al, 1997) .

La resistencia a la enfermedad es monogenética y recesiva en algunas líneas; pero en otras era más compleja con efecto variable de genes de aditividad y dominancia entre infecciones en capítulo y raíz. De esta manera no podría predecirse la capacidad de resistencia al ataque, según la respuesta de las líneas parentales (Gulya et al, 1997). La agresividad de las cepas ha sido poco estudiada en nuestro país. De acuerdo con trabajos de Thuault y Tourvielle (1988) la resistencia de un determinado genotipo no depende sólo de la cepa fúngica utilizada. Mesterházy y Gulya (1988) hallaron una fuerte interacción cepa-cultivar (Martinez et al, 1992).

Se ha citado el “escape” a la infección en girasol debido al tipo de hábitat de crecimiento (Le Clercq, 1973). La tolerancia a veces puede ser atribuida la lignificación del tejido hospedante en respuesta a tratamiento de día largo en tallo (Steadman, 1979).

La obtención de líneas y de híbridos resistentes por mejoramiento e ingeniería genética ha sido una de las estrategias más altamente investigada.

#### -Control biológico:

##### A) aspectos generales:

Durante los últimos años han habido numerosas investigaciones en relación con potenciales antagonistas de patógenos vegetales. Ésta es una interesante alternativa para el control de las enfermedades debido a las consecuencias que puede traer el uso de agentes químicos de forma indiscriminada, que involucran contaminación y alteración del equilibrio del sistema agronómico.

Un organismo antagonista es aquel capaz de interferir en la vida de un patógeno en cualquier estadio y en cualquier nivel. El biocontrol puede ejercerse indirectamente, a través de las prácticas culturales, incluyendo rotación de cultivos, inundaciones, agregado de materia orgánica, etc lo que de algún modo tendría relación con el aumento directo de la densidad poblacional de los antagonistas residentes (Chet y Baker, 1980); o bien puede realizarse directamente a través de la incorporación de antagonistas que están la mayor parte o todo el ciclo de vida en el interior del hospedante, determinando una resistencia inducida. El control se da dentro de la planta. Otra estrategia para la

incorporación de un antagonista a un cultivo es aplicarlo sobre la superficie de la planta o del suelo. En este caso la interacción entre patógeno-antagonista se da en el sitio de la infección o en los alrededores; fuera de la planta o bien incorporandolos junto con pesticidas químicos en dosis reducidas (Chet, 1987) (control integrado).

Los mecanismos de las interacciones entre el antagonista y el patógeno pueden involucrar (Cook y Baker, 1983):

- a) Antibiosis por producción de metabolitos de bajo peso molecular capaces de difundir, y que actúan inhibiendo el crecimiento de otro microorganismo.
- b) Competición por nutrientes, cuando el microorganismo biocontrolador contribuye a la disminución de una sustancia limitante para el crecimiento del patógeno.
- c) Resistencia inducida en un hospedante frente a determinado patógeno dado, por la presencia de otro microorganismo capaz de colonizar el tejido de la planta (Smedegaard- Peterson, 1985)
- d) Micoparasitismo destructivo o necrotrófico, en donde el contacto directo entre dos organismos tiene como resultado la muerte de uno de ellos seguida por la utilización de los nutrientes por parte del otro (Lumsden, 1992).

#### B) estrategias implementadas:

Los microrganismos pueden provenir de la población natural de organismos que habitan en los órganos atacados, o bien de otros hábitats, en este caso es de esperar que estén menos adaptados al medio ambiente que los pobladores naturales (Blakeman, 1985)

Encontrar un microorganismo antagonista dentro de los pobladores comunes resulta difícil, muchas veces son aquellos hongos que no son frecuentes.

Una estrategia a tener en cuenta es el incremento artificial de la población en la época del año en la que éstos grupos constituyen un componente dominante de la micoflora. Muchos hongos filamentosos pueden no ser efectivos, especialmente si el período de dominancia coincide con el comienzo de la senescencia en donde poco necesario restringir el desarrollo del patógeno. En estos casos puede actuar previniendo la dispersión sobre otras partes sanas de las plantas (Blakeman, 1985).

Por otro lado pueden hacerse observaciones de antagonistas en condiciones de

cultivo in vitro que no contemplan todas las variables y los resultados en condiciones naturales no son los mismos.

El uso de hiperparásitos para controlar en forma específica una enfermedad puede resultar una medida efectiva para reducir el inóculo del patógeno. Kranz (1981) ha realizado revisiones sobre el uso de hiperparásitos en el control biológico de patógenos foliares.

En el caso del uso de microorganismos que son antagonistas potenciales y que no forman parte de la población natural, algunos autores consideran mejor emplearlos en aquellos momentos en que grupos taxonómicos similares predominan en la población. Además, debido a que probablemente estarán menos adaptados para el crecimiento y supervivencia en la superficie de la planta, será de utilidad realizar repetidas aplicaciones del mismo (Blakeman, 1985).

En algunos casos se ha empleado bacterias del suelo (Thomson et al, 1976), pero los organismos foráneos más utilizados para el control biológico son los hongos filamentoso aislados del suelo (Blakeman, 1985).

La elección de la especie o cepa antagonista depende de muchos factores; pero uno de los más importantes es la naturaleza del patógeno a ser controlado. Esto ayudará a seleccionar el mecanismo apropiado para su control, aunque las propiedades ideales del antagonista pueden no encontrarse en un único organismo. Un objetivo a largo plazo sería incorporar tales propiedades en un organismo por ingeniería genética (Blakeman, 1985).

#### Antecedentes del control biológico sobre *S. sclerotiorum*:

En los últimos años, más de 30 especies de hongos, bacterias, insectos y otros organismos han sido utilizados para parasitar o interferir con el crecimiento de este patógeno. Alentadores resultados de control biológico de las enfermedades causadas por especies de *Sclerotinia* en algunos cultivos han sido obtenidos por incorporación en el suelo de hongos micoparásitos tales como *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium roseum*, *G. virens*, *Sporodesmium sclerotiorum* y *Trichoderma viride*. Los micoparásitos destruyen los esclerocios existentes o inhiben la formación de otros nuevos y así reducen marcadamente la población del suelo.

Algunos investigadores sugieren que la dinámica de la población de *S. sclerotiorum* y de sus hiperparásitos puede ser influenciado por el tipo de cultivo, hospedante o no hospedante y el tipo de cosecha, si es monocultivo o si hay rotación (Huang y Kozub, 1991)

En nuestro país, en laboratorio, Andreoli et al (1990) realizaron ensayos en laboratorio para establecer la capacidad antagónica de diferentes cepas de *Pseudomonas fluorescens* para el control del ataque en girasol.

En experiencias de campo, Escande y colaboradores (1994) realizaron pruebas empleando conidios de *Trichoderma* mezclados con harina de maíz y utilizaron a las abejas como agentes de dispersión del biocontrolador. A través de éste método lograron disminuir la incidencia de la enfermedad durante el período de evaluación del experimento

## **OBJETIVOS**

## PARTE I:

Estudiar el ataque de *S. sclerotiorum* en las piezas florales de las variedades HA 302 y HA 89 mediante cortes histológicos en tres tiempos posteriores a la inoculación, determinando en cada muestreo las diferencias entre las mismas con el fin de entender su comportamiento diferencial frente al patógeno.

Analizar, utilizando el método de análisis de componentes principales (ACP) el ataque de las piezas florales en las dos variedades y en los tres tiempos con el fin de establecer cuál de dichas piezas permite diferenciar a las variedades por su aporte a cada componente.

## PARTE II:

Obtener aislamientos de hongos a partir de diferentes piezas florales de *H. annuus*, realizar su identificación taxonómica y determinar la frecuencia de las mismas para cada pieza floral y para cada variedad.

Evaluuar la capacidad antagonista de las cepas fúngicas obtenidas, mediante cultivo “in vitro” frente al patógeno (cultivos duales)

Comparar las frecuencias de cepas antagonistas en variedades tolerantes (VT) y variedades susceptibles (VS) estableciendo relaciones con los distintos comportamientos frente al patógeno.

Seleccionar cepas antagonistas con el fin de realizar pruebas para el control biológico de la enfermedad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## LUGAR DE MUESTREO:

Las plantas fueron sembradas, inoculadas y cosechadas en el Campo Experimental de la Empresa ZENECA S A I C., ubicado en la ciudad de Balcarce, Provincia de Buenos Aires.

## PARTE I:

### 1. ESTUDIOS DEL ATAQUE SOBRE LAS PIEZAS FLORALES:

#### 1.1-PLANTA HOSPEDANTE:

Las experiencias se realizaron sobre plantas de girasol (*Helianthus annuus*) de diferentes variedades. En base a pruebas realizadas por investigadores de la empresa Zeneca se evaluó la producción de semillas de cada una de ellas y se observó una respuesta diferencial de las mismas frente al patógeno. De acuerdo con ésto se categorizó a estas variedades en dos grupos: -tolerantes aquellas que tienen un menor porcentaje de pérdidas ante el ataque del patógeno y sensibles las que presentaron un porcentaje mayor.

Las variedades con las que se trabajó fueron las siguientes:

-Tolerantes:	Susceptibles:
Z AV-8410	HA 300
Z 20018	Z 20028
Z 30358	Z 20303
Z 30629	HA 89
HA 302	Z 30154
SD	

Prefijo Z: indica que la variedad pertenece a la Empresa Zeneca.

Se realizaron en forma paralela experiencias a campo y en invernáculo. Para el primer caso se sembraron entre 12 y 25 plantas y 6 en invernáculo de cada variedad.

Éstas fueron distribuidas al azar en dos grupos, uno destinado a la inoculación del patógeno y el otro para utilizar como testigo (plantas no inoculadas). Dentro de cada uno de ellos las plantas se distribuyeron aleatoriamente en los tres tiempos de cosecha que se consideraron.

Las variedades SD y Z 20028 se sembraron sólo a campo.

## 1.2-HONGO PATÓGENO:

Se trabajó con una “población” patógena, aislada de Balcarce, del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* obtenida a partir de esclerocios que fueron inducidos en condiciones de laboratorio a germinar carpogénicamente. Para ello se colocaron en freezer a -20°C y luego en cámara húmeda (bandejas con tierra estéril o perlita húmeda estéril) durante 1 a 3 meses. Con posterioridad se cosecharon las esporas en flujo laminar y se conservaron secas en cajas de Petri a -20°C.

### 1.2-1 INOCULACIÓN:

#### 1.2.1.1 Condiciones para la inoculación:

Los estudios de Says-Lesage y Tourvieille (1988) demostraron que el ataque se ve favorecido en el momento de la floración. Es por ello que una vez que se completó la apertura de las flores (antesis) de las dos hileras más externas del capítulo se realizó la inoculación de los mismos.

Las plantas se revisaron periódicamente para registrar el momento de la floración.

#### 1.2.1.2 Preparación del inóculo:

Se empleó una suspensión de esporas en solución acuosa con agua destilada estéril y unas gotas de detergente. Luego de su agitación para una distribución homogénea se ajustó su concentración en 5.000 esporas/ml. Posteriormente mediante el uso de un rociador, se realizó la inoculación por aspersión.

### 1.2.1.3 En el campo y en invernáculo:

Los capítulos inoculados se cubrieron con bolsas de papel con el fin de evitar la contaminación de las inflorescencias vecinas y mantener una alta humedad relativa para favorecer la infección.

Las plantas testigo se inocularon sólo con agua destilada y también se cubrieron con bolsas de papel. De este modo la única diferencia entre las plantas inoculadas y testigos fue la presencia de las ascosporas del patógeno en la solución acuosa; ambas continuaron su desarrollo en forma similar.

### 1.3 COSECHA DEL MATERIAL:

Se procedió a la cosecha de los capítulos de girasol retirándolos de la planta. Para ello se obtuvieron muestras en tres tiempos ( $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ) posteriores al momento de la inoculación:

- $t_1$ : al día siguiente (24hs)
- $t_2$ : a los 6 días
- $t_3$ : a los 12 días

Se tomó una porción del capítulo (aproximadamente 1/6) en corte radial incluyendo tanto las flores como el receptáculo.

El material fue fijado en F.A.A. (formol:acético:alcohol) y se practicaron pequeños cortes en la base del receptáculo para una más fácil penetración del mismo.

Este procedimiento se realizó sobre las plantas inoculadas y los testigos de las distintas variedades, tanto de invernáculo como de campo.

### 1.4 REAISLAMIENTO DEL PATÓGENO:

Con parte de los capítulos inoculados tanto de invernáculo como de campo, se procedió a reaislar al patógeno. Para ésto se tomaron distintas piezas: brácteas, corola, estilo, antera y ovario, los que fueron sometidos a esterilización superficial por medio de los siguientes pasos:

- 1) etanol 70% durante 1minuto.
- 2) hipoclorito de sodio 1/100 2 minutos

Las plantas usadas para realizar los reaislamientos fueron tomadas al azar de entre las variedades empleadas; se tomaron en total 24 capítulos de plantas inoculadas.

Finalmente las piezas se sembraron en APG (Anexo I) en condiciones de esterilidad y se incubaron en cámara con alternancia de 12hs de luz y 12hs de oscuridad y una temperatura entre 22°C y 26°C.

## 1.5 PREPARACIÓN DE LOS BLOQUES DE PARAFINA (D' Ambrogio de Argüeso, 1986)):

### 1.5.1 Pruebas preliminares:

1) Se tomaron porciones del receptáculo de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de base de la zona más externa del capítulo portando dos flores completas. Ésto se llevó a cabo con plantas inoculadas y testigos de la variedad HA 89 y en los tiempos t1 (24 hs) y t3 (12 días). Se realizaron cortes longitudinales (CL) con el fin de reconocer la morfología y la anatomía de las flores, así como también determinar el grado de avance del patógeno en las distintas piezas.

2) Una 2° prueba se realizó con flores completas sin receptáculo de la variedad HA 89 de material inoculado en los tres tiempos. Se practicaron tanto cortes longitudinales (CL) como transversales (CT). De este modo se evaluó la información brindada por cada tipo de corte.

### 1.5.2 Cortes definitivos:

Se tomaron muestras al azar de plantas inoculadas y testigos, de las variedades HA 302 y HA 89 sembradas a campo. Se procesaron tres plantas para cada tiempo seleccionando las flores de la parte periférica del capítulo, como se detalla en el siguiente cuadro:

VARIEDAD	TRATAMIENTO	TIEMPO	PLANTA
HA 302	INOCULADAS	t1	1 (6336-23)
			2 (6336-24)
			3 (6336-25)
		t2	1 (6336-2)
			2 (6336-6)
			3 (6336-9)
		t3	1 (6336-4)
			2 (6336-7)
			3 (6336-12)
	TESTIGOS	t1	1 (6336-8)
			2 (6336-20)
			3 (6336-13)
		t2	1 (6336-16)
			2 (6336-18)
			3 (6336-21)
		t3	1 (6336-3)
			2 (6336-17)
			3 (6336-19)
HA 89	INOCULADAS	t1	1 (6338-4)
			2 (6338-12)
			3 (6338-13)
		t2	1 (6338-2)
			2 (6338-8)
			3 (6338-17)
		t3	1 (6338-6)
			2 (6338-10)
			3 (6338-15)
	TESTIGOS	t1	1 (6338-3)
			2 (6338-11)
			3 (6338-16)
		t2	1 (6338-1)
			2 (6338-9)
			3 (6338-18)
		t3	1 (6338-5)
			2 (6338-7)
			3 (6338-14)

### 1.5.3 Deshidratación y clarificación:

A partir del material fijado en FAA se procedió a su deshidratación en serie ascendente de alcoholes y clarificación con mezclas de alcohol-xilol y xilol puro, según los siguientes tiempos:

Tratamiento	solución	Tiempo en Hs	
		material con receptáculo	material sin receptáculo
Deshidratación	alcohol 70°	2	2
	alcohol 96°	12	6
	alcohol 96°	24	8
	alcohol 100°	12	2
	alcohol 100°	12	12-16
Clarificación	alcohol 100°-xilol (1:1)	12	12
	xilol	6	6
	xilol	12	12
Inclusión (en estufa - 60°C)	xilol:parafina (1:1)	12-16	12-16
	parafina pura	24	24
	parafina pura	2	2

Se emplearon frascos color caramelo para los sucesivos cambios.

### 1.5.4 Inclusión:

Se retiraron los frascos de la estufa con el material ya infiltrado. Se volcó el contenido del mismo en una cajita de papel. El material se orientó adecuadamente en la misma mediante aguja calentada a la llama, trabajando sobre una superficie horizontal. Al comenzar a enfriarse, se colocó la caja en agua con hielo para una rápida solidificación de la parafina evitando, así cristalizaciones.

Por último se retiró el papel, y se cortó el exceso de parafina para obtener bloques más pequeños. Cada uno de ellos se colocó en un taco de madera de 2cm<sup>3</sup>

aproximadamente y se orientó según el tipo de corte a realizar. Finalmente se talló el mismo con una hoja de afeitar.

## 1.6 CORTES:

Se realizaron cortes transversales (CT) seriados del material incluido en parafina mediante micrótomo rotatorio. El espesor de los mismos fue de 15  $\mu\text{m}$ .

Una vez obtenidas las tiras correspondientes se procedió a su adhesión en portaobjetos limpios y desengrasados con alcohol 96°. Para ello las tiras se cortaron en otras de menor tamaño, según el cubreobjetos empleado. Los portaobjetos se cubrieron con una delgada capa de albúmina de Meyer y se les volcó unas gotas de agua destilada. Sobre en ellos se colocaron las tiras y se plancharon colocando los portaobjetos sobre plancha térmica a 40°C. Luego que el material y la parafina quedaron bien extendidos y lisos se colocaron en cajas con papel de filtro en el fondo y se llevaron a estufa (35-40°C) para su secado durante 24 hs como mínimo.

## 1.7 DESPARAFINADO Y COLORACIÓN DE CORTES:

Los cortes pegados a los portaobjetos y secados en estufa fueron colocados en cajas de Koplin para proceder al desparafinado. Tanto para las pruebas preliminares como para los cortes definitivos se procedió de la siguiente forma:

PROCEDIMIENTO	SOLUCIÓN	TIEMPO
Desparafinado	xilol I	15'
	xilol II	5'
Coloración	alcohol 100°	15"
	alcohol 96°	15"
	fast green	30'
	alcohol 100°	15"
	xilol	indefinido

Los cortes se mantuvieron en xilol hasta su montaje en bálsamo de Canadá artificial.

Con esta tinción los tejidos con paredes secundarias significadas se colorean en la gama del rojo (a veces puede ser oscuro). Los tejidos con paredes primarias o secundarias no significadas se colorean de celeste verdoso. Las hifas se colorean de celeste intenso.

Parte de los cortes en las pruebas preliminares de la variedad I-20002 se colorearon con azul de algodón al lactofenol y montados en gelatina glicerina

## 1.8. OBSERVACIONES:

Se realizaron observaciones de todos los cortes con microscopio óptico de luz transmitida.

## 1.9. ESTADÍSTICA:

Para el análisis de los datos se aplicó un método de ordenamiento de datos multivariados como es el análisis de componentes principales (ACP). Este método resume las principales tendencias en la variación de los datos (Kenkel y Booth, 1992). Los métodos de ordenación se basan en la idea de que un espacio de  $p$  dimensiones puede ser representado en menos dimensiones, ya que las  $p$  variables están más o menos correlacionadas.

En los cortes seriados de cada flor (muestra) se hicieron observaciones cada 15 cortes, se determinó al azar el comienzo de las mismas entre los 10 primeros correspondientes a cada flor. Los sitios en los que se observó y registró la presencia del patógeno fueron: (se detalla al lado del nombre de la pieza floral el número -en promedio-de cortes que involucra cada una de las porciones).

**COROLA:** (c/porción= 100 cortes)  
porción 1: superficie abaxial (C 1° int)  
porción 1: interior de los tejidos (C 1°d)  
porción 1: superficie adaxial (C1° ext)  
porción 2: superficie abaxial (C 2° int)  
porción 2: interior de los tejidos (C2° d)  
porción 2: superficie adaxial (C 2° ext)  
porción 3: superficie abaxial (C 3° int)  
porción 3: interior de los tejidos (C 3° d)  
porción 3: superficie adaxial (C 3° ext)  
porción 4: superficie abaxial (C 4° int)  
porción 4: interior de los tejidos (C 4° d)  
porción 4: superficie adaxial (C 4° ext)  
porción 5: superficie abaxial (C 5° int)  
porción 5: interior de los tejidos (C5° d)  
porción 5: superficie adaxial (C 5° ext)

**PAPUS:**  
superficie de la pieza (P ext)  
interior de la pieza (Pint)

**ANTERA:** (porción= 65 cortes)  
porción 1: superficie externa (A1° ext)  
porción 1: interior (A 1°d)  
porción 1: superficie interna (A 1° int)  
porción 2: superficie externa (A 2° ext)  
porción 2: interior ( A 2° d)  
porción 2: superficie interna (A 2° int)  
porción 3: superficie externa (A 3° ext)  
porción 3: interior (A 3° d)  
porción 3: superficie interna (A 3° int)  
porción 4: superficie externa (A 4° ext)  
porción 4: interior (A 4° d)  
porción 4: superficie interna (A 4° int)

**ESTIGMA:** (porción= 75 cortes)  
superficie (Est ext)  
interior (Est int)

**ESTILO:** (porción=85 cortes)  
porción 1: superficie (est 1° ext)  
porción 1: interior (est 1° int)  
porción 2: superficie (est 2° ext)  
porción 2: interior (est 2° int)  
porción 3: superficie ( est 3° ext)  
porción 3: interior (est 3° int)  
porción 4: superficie (est 4° ext)  
porción 4: interior (est 4° int)  
porción 5: superficie (est 5° ext)  
porción 5: interior (est 5° int)

**OVARIO:**  
superficie (Ov -ext)  
interior (Ov-int)

**FILAMENTOS:** (porción= 50 cortes)  
porción 1: superficie (Fil 1° ext)  
porción 1: interior (Fil 1° int)  
porción 2: superficie (Fil 2° ext)  
porción 2: interior (Fil 2° int)

Se construyó una matriz básica de datos en la que las variables fueron los sitios observados que fueron en total 47 y los casos las variedades, los tratamientos y los tiempos, asignándose el valor 1 a la presencia de micelio y 0, a la ausencia del mismo.

## PARTE II:

### 2. OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS A PARTIR DE ANTÓSFERA. SELECCIÓN DE ANTAGONISTAS DEL PATÓGENO:

#### 2.1. Aislamiento a partir del material lavado:

Para determinar la posible presencia de especies fúngicas antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* presentes en la “antósfera” de *Helianthus annuus* se hicieron aislamientos a partir de material fresco.

Las plantas con las que se trabajó fueron aquellas cuya cosecha se había realizado dentro de los dos días previos al regreso desde el campo experimental; para que se encuentren bien conservadas. Además se mantuvo en heladera (4°C) hasta su procesamiento.

Se emplearon flores completas de los capítulos correspondientes a plantas testigo en los dos últimos tiempos mencionados. En el siguiente cuadro se detallan las variedades empleadas y el número de plantas usadas en cada caso:

TOLERANTES	Variedad	unidades
	HA 302	3
	Z-AV-8410	3
	Z-20018	1
	Z-30629	3
SENSIBLES	HA 300	2
	Z-20028	2

El procesamiento del material consistió en el lavado de las flores con el aparato de lavado de Parkinson (Parkinson y Williams, 1961) empleando agua estéril.

El objetivo de este trabajo es obtener las especies fúngicas activas en la superficie de las distintas piezas florales. Esta técnica se aplicó en trabajos de suelo por Parkinson y Williams (1961). Las especies que se aislan están en estado vegetativo eliminando las esporas depositadas al azar sobre la superficie y los propágulos de las especies altamente esporuladoras.

El aparato utilizado consta de una serie de cilindros de acrílico, de 5cm de diámetro por 35cm de largo, cerrado en su parte inferior y provisto de tres aberturas, dos para la entrada y salida de agua y la tercera para la entrada de aire. En la parte superior posee una tapa con orificio para la salida de gases, que mantiene la presión atmosférica en el sistema mientras se desagota el aparato. En el interior de cada cilindro se colocan tres tamices con tamaño de poro arbitrario para los objetivos de este trabajo, separados aproximadamente 10cm entre si.

Entre la fuente de aire comprimido y la entrada al aparato se intercala un filtro de aire, para evitar la contaminación proveniente del aire. El aparato de lavado se esteriliza llenando cada uno de los cilindros con sus respectivos tamices con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante las 24hs previas a la utilización y el filtro de aire se esteriliza en autoclave durante 20' a 1,5 atm. de presión. Antes de realizarse el lavado de las muestras se elimina a fondo la solución de hipoclorito mediante sucesivos lavados con agua estéril. Ésta se obtiene mediante un equipo de filtrado Millipore conectado con la red de agua potable.

Previamente se realiza una curva de lavado, colocando las flores sobre el tamiz inferior de los cilindros, se llena la columna hasta la mitad de su volumen con agua estéril, se cierra el paso de agua y se abre la entrada de aire, se hace burbujeante durante dos minutos, luego se cierra el paso de aire y se desgota el aparato recogiéndose aliquotas de 1ml cada una del agua de lavado y se siembra en sendas cajas de Petri con agar malta. Se incuba a temperatura ambiente. Se repite este procedimiento renovando el agua 40 veces, recogiendo y sembrando 3 aliquotas de 1ml cada 5 lavados. Se cuenta el número de colonias en cada caja y se grafica el número promedio de colonias por ml de agua para los lavados testeados. Del estudio de las curvas de lavado se concluye que el número de lavados necesarios para eliminar la población esporuladora y las esporas es de 25 lavados.

Luego se recogieron las flores en cajas de Petri con papel de filtro estériles. Con posterioridad se procedió a la disección de las flores en completa esterilidad, mediante el uso de agujas y bisturí estériles en flujo laminar. Se tomaron porciones de las distintas piezas florales como se detalla:

pieza floral	porción
palea	extremo apical
papus	una pieza completa
corola	2 a 3 dientes del extremo apical
	porción suculenta basal
antera	ápices de 2 a 3 anteras
estigma	extremo apical de una de las ramas
ovario	completo

Estas porciones se sembraron en agar malta con antibióticos (Anexo I), colocando 5 de ellas por caja de Petri en forma equidistante. Se dejó crecer a temperatura ambiente y se repicaron las cepas fúngicas obtenidas en tubos con agar-malta en pico de flauta. Se conservaron en heladera (4°C).

## 2.2. Aislamiento de endofitos:

Con el fin de aislar posibles endofitos de ovario se procedió a la esterilización superficial de los mismos.

Se realizó la disección de parte de las flores lavadas con agua estéril para tomar sólo el ovario. Sobre ellos se practicó una esterilización superficial. En una primera etapa se trabajó con las variedades HA 302 (3 capítulos) y HA 300 (1 capítulo). En una segunda etapa se trabajó con las variedades Z 30629 (3 capítulos) Z 20018 (1 capítulo) HA 300 (1 capítulo) Z AV-8410 (3 capítulos) y Z 20028 (2 capítulos).

Para la esterilización luego de la disección de los mismos se realizó el pasaje por alcohol e hipoclorito de sodio como se detalla:

- 1º caso: a) alcohol 50% durante un minuto.  
b) hipoclorito de sodio 2:1 - 2 minutos para ovarios jóvenes.  
- 3 minutos para ovarios maduros.  
c) enjuague con agua destilada estéril.
- 2º caso: (se siguieron los pasos según la bibliografía consultada- Petrini 1986-)  
a) un minuto en alcohol 96°  
b) 3 minutos en hipoclorito de sodio 1:5  
c) 30 segundos en alcohol 96°.  
d) enjuague con agua destilada estéril.

Luego de la esterilización superficial de las piezas florales se sembraron en cajas de Petri con medio (agar-malta), colocando 5 piezas por cada una de ellas en forma equidistante. Se incubó a temperatura ambiente y luego de realizaron repiques en tubos con agar malta en picos de flauta.

### 2.3 Identificación taxonómica de las cepas fúngicas aisladas :

Las cepas aisladas fueron gradualmente sembradas en cajas de Petri con diferentes medios para su estudio e identificación. Los medios utilizados fueron: APG, AGAR-MALTA y Gorodkwa's agar (Anexo I).

Para la identificación taxonómica se consultó entre otros a: Ellis (1971, 1976), Carmichael et al (1980), Hughes (1951), Nelson & Toussoun(1983), Booth (1977), Rapper y Fennell (1965) y Sutton (1980).

Para la determinación de los aislamientos levaduriformes se procedió al sembrado en medio de Gorodkwa y se realizó microcultivo con APG en portaobjetos excavado.

### 2.4. Determinación de la frecuencia de las cepas fúngicas:

Con el objeto de saber cuáles son las especies más importantes por su frecuencia en cada pieza floral, se obtuvo la frecuencia de las especies aisladas de variedades tolerantes y susceptibles de dos tiempos ( $t_2$  y  $t_3$ ). Para ello luego de la identificación taxonómica se calculó para cada especie y para cada pieza :

F= frecuencia de aparición de cada especie

$$F = \frac{n^{\circ} \text{ de veces que aparece una especie}}{n^{\circ} \text{total de trozos de la pieza considerada}} \times 100$$

## 2.5.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA:

Luego de realizar el aislamiento e identificación taxonómica de las cepas fúngicas obtenidas, se procedió a la evaluación de la capacidad antagonista de cada una de ellas frente a *Sclerotinia sclerotiorum*. Dicha evaluación se realizó mediante enfrentamientos “in vitro” de las mismas con el patógeno, conocido como cultivos duales.

Las interacciones patógeno-cepa se estudiaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo agar-malta. Para ello se colocaron los inóculos en forma opuesta separados por 4 cm entre sí de acuerdo con la bibliografía consultada, para la siembra de los inóculos fue tenida en cuenta la velocidad diferencial de crecimiento de la cepa y del patógeno.

En la mayoría de los casos, las cepas aisladas poseerían una velocidad menor, por lo tanto, se sembraron con anterioridad a *S. sclerotiorum*. Se dejó que la colonia alcance 2-3 cm de diámetro y luego se enfrentó al patógeno. Las cepas pertenecientes a los géneros *Fusarium sp* y *Circinella sp* tienen una tasa de crecimiento semejante al patógeno; en estos casos se sembraron ambos el mismo día o cuando la colonia del aislamiento tenía 1 cm de diámetro. Los inóculos se enfrentaron separados por 4 cm, y se dejó crecer a temperatura ambiente (15-23°C) y con alternacia de períodos de luz-oscuridad 12 hs:12hs. Para cada par enfrentado, se sembraron también cajas control, una con el patógeno y otra con la cepa en estudio.

Para medir la inhibición del crecimiento se tomó el radio de crecimiento de las colonias enfrentadas y testigo y se calculó el porcentaje de inhibición radial (%ICR) como se detalla:

$$\%ICR = \frac{(r_1 - r_2) \times 100}{r_1}$$

donde:   
 r<sub>2</sub>= radio de la colonia del lado  
 enfrentado  
 r<sub>1</sub>= radio de la colonia testigo

El radio de la colonia fue medido en la línea que une el centro de las dos colonias.

La siembra de las cajas testigo se realizó no sólo para evaluar el radio de crecimiento sin interacción, sino también con el fin de establecer posibles cambios en el aspecto de las colonias, tales como cambios de color de la colonia o de la zona de contacto de las mismas, cambios en su forma, densidad del micelio aéreo, etc.

También se midió, en determinados casos la distancia (d) a la que se detiene el crecimiento (halo de inhibición).

Se realizaron enfrentamientos con cepas obtenidas tanto de variedades susceptibles como tolerantes con el fin de evaluar además de la posible diferencia en las poblaciones fúngicas en ambas variedades , la diferencia en la capacidad antagonista de las mismas.

## MEDIOS Y SOLUCIONES EMPLEADOS:

### APG: Agar papa glucosado:

papas	200 gr
Agar	15 gr
Agua	1000 ml
Glucosa	20 gr

### G: Gorodkwa's agar

Glucosa	1gr
Neopeptona	10gr
Cloruro de Sodio	5gr
Agar	30gr
Agua destilada hasta	1.000 ml

### AGAR MALTA:

Agar	15gr
Malta	20gr
Glucosa	20gr
Peptona	2gr
Agua destilada	1000ml

### AGAR MALTA con antibióticos:

Solución de Antibióticos 1ml c/100ml de agar-malta.

## SOLUCIÓN DE ANTIBIÓTICOS:

Estreptomicina	0,5gr
Chlorotetracyclina	0,25gr
Agua destilada	100 ml

## F.A.A.: solución fijadora (100 ml)

Alcohol	50 ml
Ácido Acético	5 ml
Formol	10 ml
Agua destilada	35 ml

## **RESULTADOS**

## PARTE I:

### ESTUDIO DEL ATAQUE SOBRE LAS PIEZAS FLORALES

#### 1.1 Caracteres morfológicos y sintomatología de las inflorescencias:

A continuación se describen las observaciones de algunos caracteres morfológicos y de la sintomatología de las inflorescencias en las variedades empleadas en los estudios anatómicos:

##### 1.1.1 Variedad HA 302:

La inflorescencia se caracteriza por poseer forma convexa: grado 3 -escala Knoules- (Seiler, 1997) con brácteas abrazadoras hasta el 50% de su longitud y luego abiertas. La corola tubular es relativamente más abierta que la presentada por la otra variedad. En el tiempo t3 puede observarse melanización en parte de los aquenios.

Con respecto a la sintomatología, en t2 puede observarse algunas de las flores con manchas acuosas en la corola y otras algo necrosadas. Hay desarrollo de micelio blanco en la superficie. En el t3 se observa gran cantidad de micelio blanco. Hay gran cantidad de corolas necrosadas. También se ve en algunas flores que la necrosis llega al ovario pero sólo si no está melanizado.

##### 1.1.2 Variedad HA 89:

Esta variedad presenta receptáculo de tipo plano cóncavo, grado 2 (escala Knoules) con brácteas involucrales muy abrazadoras quedando sólo el 1/3 apical libre; pero éstas junto con la ligulas de las flores periféricas cubren parcialmente la inflorescencia. La corola, también tubular es relativamente más cerrada que la que presentan las flores de la otra variedad.

En relación con la sintomatología en t2 puede verse escaso micelio en la periferia del capítulo. En t3 se ven algunas manchas acuosas blandas en las brácteas, también hay abundante micelio no sólo en las flores de la periferia sino también en las ligulas. Hay abundante desarrollo sobre todo en las anteras y manchas necróticas en las corolas. Se observó escaso desarrollo de micelio en la zona central.

### 1.2 Reaislamiento del patógeno:

Esta tarea se realizó en parte del material inoculado, realizando un muestreo al azar. En el caso de las variedades empleadas los porcentajes de reaislamiento (% R) fueron los siguientes: HA 302 en t2: 26.67 %, en t3: 48% y HA 89 en t2: 30 % y en t3: 70% (Tabla 1.1)

El reaislamiento permite comprobar la eficiencia del método de inoculación, ésto unido al hecho de que se observa la sintomatología característica de la podredumbre del capítulo causada por *S. sclerotiorum*, permite cumplir con los postulados de Koch (Fernández Valiela, 1978).

	Variedad HA 302		Variedad HA 89	
	t2	t3	t2	t3
pieza	% R	% R	% R	% R
Bráctea	0	20	25	50
Corola	33.33	60	50	100
Antera	66.67	80	50	100
Estigma	33.33	40	50	50
Ovario	0	20	0	50
Total	26.67	48	30	70

Tabla 1.1: porcentajes de reaislamientos (%R) para las diferentes piezas en las dos variedades

Por otra parte es interesante notar que las anteras son las piezas florales con mayores porcentajes de reaislamiento en los dos tiempos considerados en la variedad HA 302 y también para la variedad HA 89. En esta última la corola presenta los mismos porcentajes que las anteras en ambos tiempos.

### 1.3 PRUEBAS PRELIMINARES:

- 1) Como ya fue detallado se tomaron las flores más externas incluyendo la parte basal de las brácteas internas del capítulo y se realizaron cortes longitudinales. En base a lo observado se pudo establecer que el patógeno se desplaza a lo largo de las flores en

- sentido longitudinal fundamentalmente, hasta alcanzar el ovario y sin crecimiento a través de la zona de las brácteas. dado que existen dos posibles vías de ataque del parénquima lacunar del receptáculo: 1) a través de las brácteas internas y 2) a través del ovario ( Lamarque, 1985); de este modo éstas pruebas permitieron descartar la primera de ellas. Por otra parte dado que sólo había ataque hasta la porción superior del ovario, sin invasión del receptáculo se decidió la inclusión en parafina sólo de las flores y de este modo acortar los tiempos de infiltración del material.
- 2) La segunda de las pruebas permitió evaluar la información brindada por los dos tipos de cortes (CL y CT). Se optó por el segundo de ellos con el fin de realizar un seguimiento del avance del patógeno en sentido longitudinal a través de las distintas piezas florales registrando adecuadamente la presencia del mismo en cada una de ellas para su posterior procesamiento por el análisis de componentes principales. Como se mencionó, parte de los cortes fueron colocados en azul de algodón. En este caso los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, los tejidos no se colorearon y si bien las hifas se colorean de azul no permitía realizar buenas observaciones del ataque por lo que quedó descartado.

Con respecto a la anatomía se corroboraron las características de los tejidos descriptas por Seiler (1997).

#### 1.4 DESCRIPCIÓN DEL ATAQUE DE *S. SCLEROTIORUM* EN LAS DISTINTAS PIEZAS FLORALES EN LAS DOS VARIEDADES:

##### 1.4.1 VARIEDAD HA 302:

###### TIEMPO 1:

###### COROLA:

El micelio observado en este tiempo ha sido en general muy escaso; en particular en esta pieza floral. No se ha detectado presencia de esporas en la superficie ni micelio dentro de los tejidos.

En la superficie externa el micelio es escaso y está a veces asociado a la

presencia de polen. Hay cierta coloración rojiza en la células epidérmicas de la corola en presencia de hifas. Éstas células se ven más achatadas que aquellas del mismo tejido sin presencia de micelio.

En la superficie interna el desarrollo de micelio fue considerablemente mayor que en la superficie externa y muchas veces está relacionado con la presencia de polen, también se observa coloración rojiza en las paredes de las células epidérmicas en presencia de hifas (Figura 1.3 A).

#### PAPUS:

No se observó presencia de micelio sobre ni dentro de esta pieza floral.

#### ESTIGMA:

Se observan hifas cortas sobre la superficie. Éstas se encuentran asociadas a las papilas de la superficie, disponiéndose entre ellas, a veces acompañando granos de polen (Fig. 1.4 A y B).

En el interior de los tejidos no se observó proliferación de micelio. Sin embargo en una de las flores observadas sus células se encuentran algo colapsadas y con coloración rojiza en las paredes, lo que no se observa en otras flores (Fig 1.2 B-C). El colapso de las células en ciertas zonas es considerable y no permite determinar, la presencia de micelio dentro de los tejidos. Donde no hay colapso no se ve micelio en el interior.

#### ESTILO:

Esta parte del gineceo presenta desarrollo de micelio en superficie, muchas veces relacionado con la presencia de polen. También se puede ver la coloración rojiza mencionada en estigma; pero no en forma generalizada y sólo en una de las flores, que es la que presenta mayor proliferación de micelio. Ésta abarca todos los tejidos en la parte superior de esta pieza, pero luego queda reducida al tejido parenquimático que rodea al tejido vascular y el canal estilar. Se ve micelio en superficie hasta el cuarto superior de esta pieza; donde está asociado con la presencia de granos de polen .

Dentro de la porción donde se observa micelio en superficie, el colapso

presente en las células, no permite determinar si hay micelio en el interior de dichas células. A partir de allí el colapso es menor y luego las células van adquiriendo las características típicas que presentan las flores sin ataque, donde puede afirmarse que no hay micelio. Además, quizás apoyando la idea de que el colapso en los tejidos se relacione con la presencia del patógeno se ve que el estilo presenta aspecto asimétrico con colapso del tejido sólo donde se observa presencia de hifas en superficie y asociado a granos de polen.

En este tiempo (24 hs después de la inoculación) hay cierta diferencia entre las flores muestradas, una de ellas (flor1) mayor desarrollo de micelio, pero siempre sólo en la superficie, lo cual podría estar ligado a las condiciones ambientales posteriores a la inoculación.

#### OVARIO:

No se detectó presencia del patógeno.

#### ANTERAS:

En este tiempo el desarrollo de micelio es mayor en una de las flores (flor 1) y se pone más en evidencia en esta pieza floral.

El crecimiento fue escaso detectándose presencia del patógeno en ambas superficies y siempre ligada a la presencia de granos de polen. Sin embargo la flor antes mencionada (flor 1) presenta mayor proliferación del micelio en las dos superficies de las anteras, a veces asociado con polen. En promedio se observa crecimiento en superficie hasta el cuarto superior (1/4).

#### FILAMENTOS DE LOS ESTAMBRES:

Las flores con menor proliferación carecen de micelio sobre y dentro de los filamentos.

## TIEMPO 2:

### COROLA:

La proliferación de micelio es considerablemente mayor a la observada en el tiempo anterior. Sin embargo no ha habido penetración en los tejidos de la corola.

En la superficie externa el micelio es muy escaso, en algunos de estos sitios está asociado a granos de polen, llegando a observarse hasta el cuarto superior de esta pieza.

En la superficie interna el crecimiento del micelio es muy importante. Lo que se ha podido observar es que el desarrollo se da fundamentalmente casi hasta la zona media de la corola. El micelio se adhiere a la superficie sin llegar a entrar en los tejidos. A veces puede observarse desorganización de los mismos asociada a dicha proliferación. También en este caso hay cierto colapso en las células epidérmicas con coloración rojiza en las paredes de las mismas.

### PAPUS:

En este tiempo no se observó desarrollo del micelio en ninguna de sus superficies ni en el interior de los tejidos.

### ESTIGMA:

El desarrollo se da sólo en la superficie; no se detectó la invasión de los tejidos. El micelio crece en forma muy abundante entre las papilas del estigma. Es interesante destacar que los tejidos se colorean de rojizo en las flores atacadas (como ya se mencionó). En ciertas zonas del estigma se ha observado que las papilas están colapsadas y coloreadas de rojo. Esta coloración se observa en el estigma por zonas, aparentemente como reacción frente al patógeno. Ésta no se presenta en las flores sin ataque (testigo) y se observa en todas las flores inoculadas.

### ESTILO:

El desarrollo de micelio a lo largo del estilo se da fundamentalmente en la

superficie. Hay proliferación hasta el tercio superior de esta pieza. En muchos casos ligado a la presencia de polen.

En algunos sectores del estilo se puede observar el colapso de los tejidos, en estos casos no puede determinarse con certeza si hay micelio en el interior. Este colapso es especialmente más intenso en una de las flores. En las zonas del estilo que no presentan dicho colapso, puede asegurarse que no hay desarrollo de micelio dentro de los tejidos.

#### OVARIO:

No se observó desarrollo de micelio ni en la superficie ni en el interior.

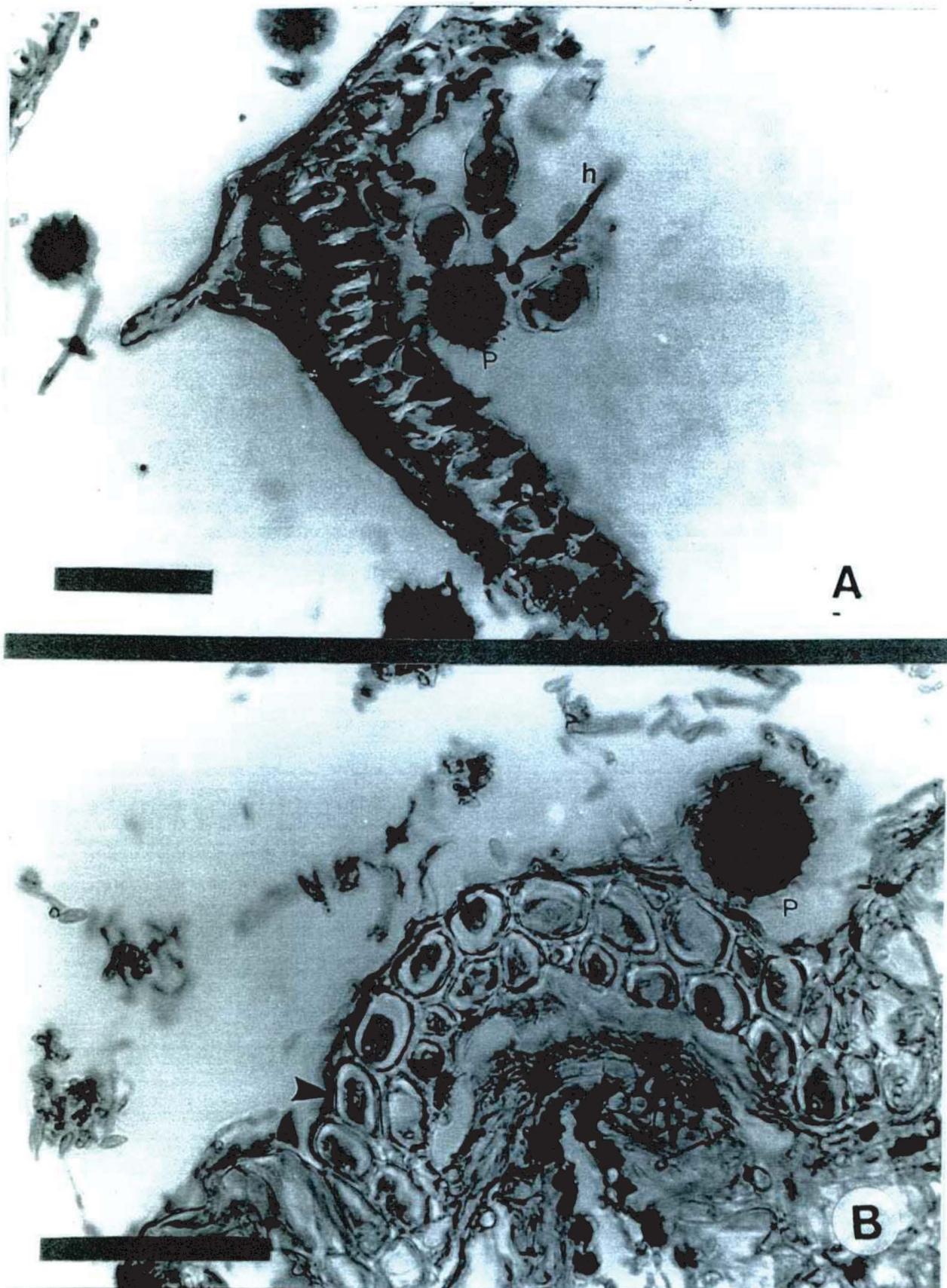
#### ANTERAS:

La proliferación del micelio del patógeno es muy importante en esta pieza floral; es considerablemente mayor a la observada en el tiempo anterior. Hay profuso desarrollo en torno a los granos de polen, tanto dentro del tubo formado por las anteras como fuera de él.

En la superficie externa es muy importante el desarrollo de hifas; en especial en la zona del conectivo, además en presencia de hifas se observa la rotura de la epidermis y del tejido parenquimático junto con la desorganización de las células. Las hifas se mantienen adheridas a la superficie, y la entrada se produce a través de las cutícula e intercelularmente. A veces puede verse la separación de la cutícula del resto del tejido relacionada con la presencia del patógeno que crece entre la cutícula y la epidermis.

Superficie interna: también el desarrollo es muy importante; pero alcanza una densidad menor que en la superficie externa.

Interior: muchas veces puede observarse el tejido del conectivo roto en presencia de hifas sobre la superficie; pero no puede asegurarse que haya penetración en



**Fig. 1.1 A-B** Fotomicrografía de anteras en CT de la V HA 89 (VS) c/ MO. **A**, t2 hifas en ambas superficies y en el interior de la epidermis. **B**, t3 presencia de hifas en el tejido conectivo (flecha). h: hifa; p: polen. Esc: 60  $\mu$ m.

este caso. También es posible observar la presencia de micelio intracelular en el interior de la epidermis en el cuarto superior de esta pieza.

La entrada de las hifas se produce a través de la cutícula como fue citado en la bibliografía (Abawi et al, 1975; Boyle, 1921; Lumsden & Dow, 1973 Purdy, 1958); a veces se observa el desprendimiento de la misma con micelio dispuesto entre ella y el tejido.

Generalmente el ingreso se da en el espacio intercelular para luego ingresar dentro de las células en algunos casos, permaneciendo intercelularmente otras veces.

#### FILAMENTOS DE LOS ESTAMBRES:

No hay desarrollo de micelio .

#### TIEMPO 3:

##### COROLA:

En este tiempo el ataque en esta pieza floral es notablemente más importante que en los anteriores.

En la superficie externa hay importante desarrollo de micelio; muchas veces en presencia de granos de polen. Hay desarrollo de micelio aproximadamente hasta la cuarta parte de esta pieza, en forma discontinua.

En la superficie interna: la proliferación del micelio del patógeno es mayor a la observada en la superficie externa. El desarrollo se produce en forma continua, sobre toda la superficie. A veces relacionados con la presencia de granos de polen; pero esta asociación no es tan importante como en los primeros tiempos. El avance se da hasta la mitad de la superficie interna de la corola.

Hay desarrollo de micelio en el interior de los tejidos, dentro. Si bien en las distintas flores muestreadas el ingreso de las hifas es en diferentes zonas de la corola, su desarrollo alcanza aproximadamente un tercio del largo total; pero no se observa en forma continua en toda la pieza floral.

En los cortes de las flores de esta variedad es común reconocer la

coloración rojiza (coloración con safranina) en los tejidos de la corola; esta coloración no es continua, ciertas zonas de la corola se ven en color celeste (fast green). La coloración rojiza puede relacionarse con la presencia de hifas. De hecho en algunos cortes sólo se ve dicha coloración en las paredes de las células y también un depósito rojizo, cuando hay micelio y no cuando éste no se presenta.

En otros cortes se ve la coloración mencionada en ausencia de micelio, dentro de los tejidos, éstos se encuentran en superficie o se trata de zonas cercanas a aquellas invadidas por el patógeno. Además de esta coloración la corola presenta muchas veces las células colapsadas o deshidratadas y tiene un espesor menor al que presentan las flores testigo, y una marcada desorganización de los tejidos (Fig. 1.3 B y C).

#### PAPUS:

Parte de las flores no conservan esta pieza, pero en ninguno de los casos pudo observarse presencia de hifas.

#### ESTIGMA:

La proliferación del micelio es muy importante. Hay desarrollo tanto en superficie como en el interior de los tejidos , inclusive puede observarse dentro del canal estigmático (Fig. 1.4 D).

El crecimiento de micelio se produce entre las células. Estas hifas son más gruesas a las observadas en tiempos anteriores y a aquellas que se desarrollan fuera de los tejidos. Las células del estigma presentan una coloración rosada intensa a rojiza (Fig. 1.4 C).

#### ESTILO:

En todos los casos hay desarrollo de micelio a lo largo de la superficie del estilo; abarcando 1/2 de la longitud total. Dos de las flores presentan crecimiento dentro de los tejidos, en estos casos se ve micelio dentro del tercio superior. Hay colapso en los tejidos hasta la mitad de esta pieza. Inclusive en una de las flores se observa por debajo de la zona con mayor colapso que el estilo se ve asimétrico, probablemente debido a la

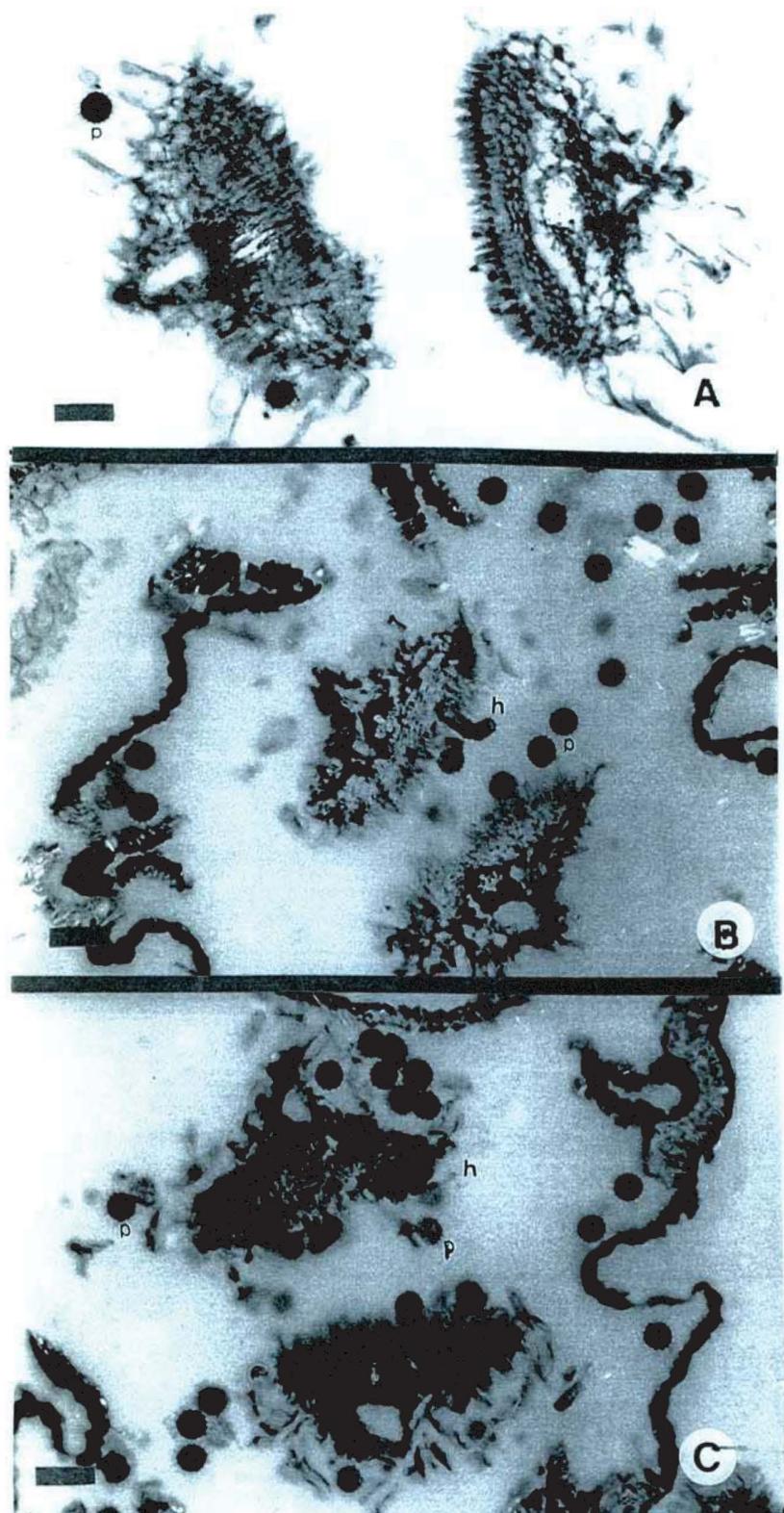


Fig. 1.2 A-C Fotomicrografía de ramas estigmáticas en CT de la V HA 302 (VT) c/ MO: A, testigo en t1. B, t1 presencia de hifas en superficie, colapso celular. C, t1 importante colapso y oscurecimiento del tejido estigmático que se colorea con safranina (rojo), presencia de micelio en superficie. h: hifa; p: polen. Esc. 60  $\mu$ m.

presencia de micelio, contrariamente a lo observado en las flores testigo. La zona con ataque del patógeno presenta sus células más colapsadas y oscurecidas.

En ciertas zonas del estilo no puede determinarse si hay hifas presentes debido al colapso de sus tejidos y el oscurecimiento del contenido celular que nuevamente se colorea en rojo, esta reacción se puede observar aproximadamente hasta la mitad del estilo.

#### OVARIO:

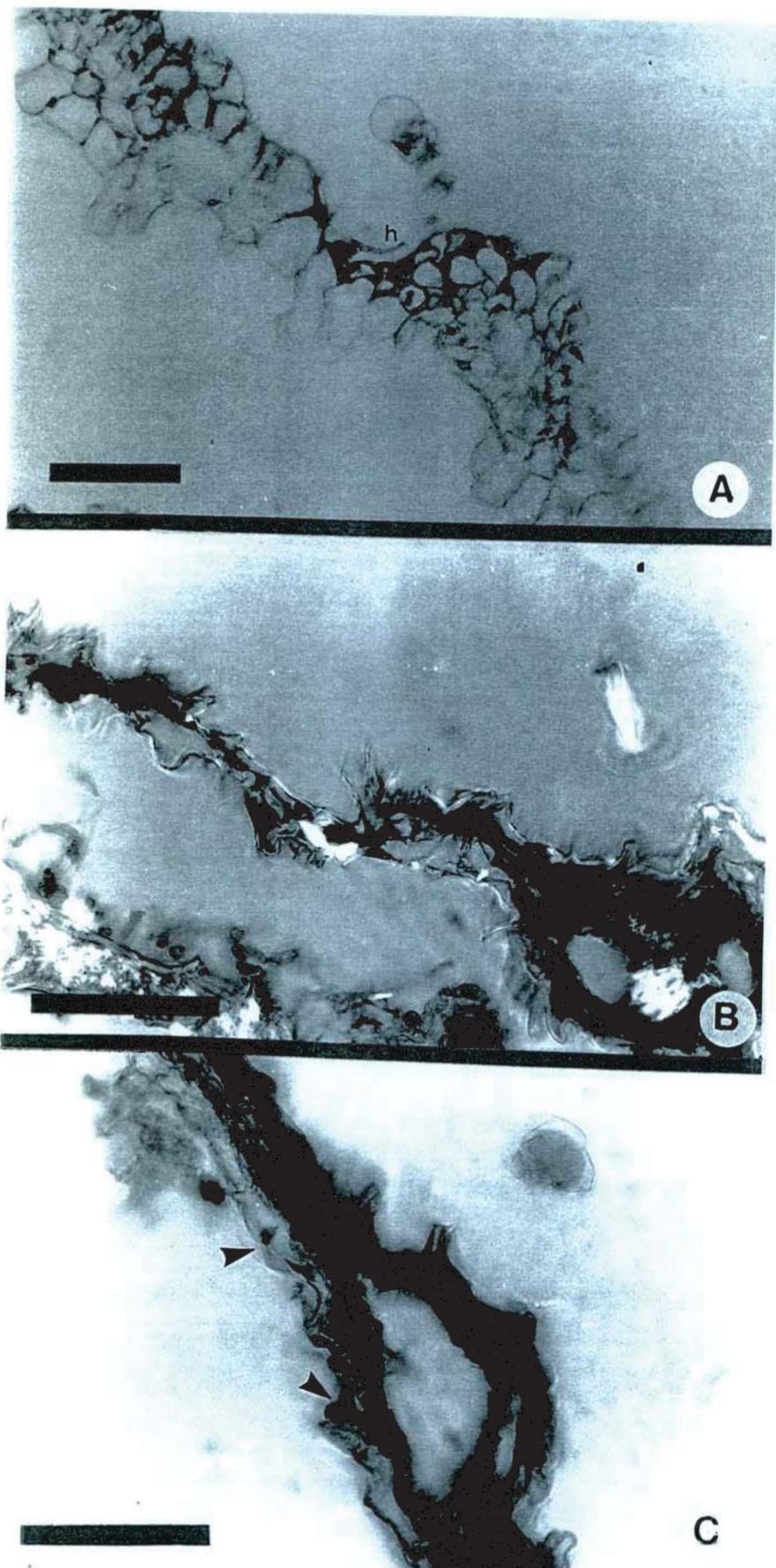
El avance del patógeno no alcanza en este tiempo los tejidos de esta pieza.

#### ANTERAS:

El desarrollo de micelio abarca tanto la superficie interna como externa y el crecimiento dentro de los tejidos en forma continua a lo largo de las paredes de las anteras. Siendo mucho más denso y abundante en la zona del conectivo. A veces éste se ve notablemente desorganizado. El desarrollo en el interior abarca toda la longitud de las anteras.

#### FILAMENTOS DE LOS ESTAMBRES:

Hay proliferación de micelio hasta casi la mitad del largo total de los filamentos en la superficie y también se puede observar dentro de los tejidos. Hay hifas dentro de la epidermis y del tejido parenquimático. No siempre puede verse en el tejido vascular; pero a veces la zona ocupada por este tejido se observa vacía y con presencia de hifas.



**Fig. 1.3 A-C** Fotomicrografía de la corola de la V HA 302 (VT) en CT c/ MO: **A**, t1 se observa el oscurecimiento y ligero colapso en las células de la superficie en presencia de hifas. **B-C**, t3 notable colapso y oscurecimiento del tejido que toma con safranina (rojo): **B**, presencia de hifas en superficie **C**, presencia de hifas en superficie y en células epidérmicas con menor colapso que las restantes (flecha). h: hifa. Esc: 60  $\mu$ m.

#### 1.4.2 VARIEDAD HA 89:

##### TIEMPO 1:

###### COROLA:

Hay proliferación de micelio en ambas superficies, pero no dentro de los tejidos de la corola, en promedio abarca hasta el  $\frac{1}{4}$  superior.

En la superficie externa hay desarrollo de micelio pero es relativamente escaso, muchas veces se encuentra asociado con granos de polen y se presenta dentro del cuarto superior. Se detectan escasas esporas del patógeno.

En la superficie interna: el crecimiento del patógeno es mayor que en la superficie externa, es decir presenta desarrollo más denso. En algunos casos se ha visto el ligero colapso de las papilas epidérmicas tal como fue descripto por Sedún y Brown (1987).

###### PAPUS:

No se detectó micelio ni esporas del patógeno.

###### ESTIGMA:

Hay proliferación de las hifas del patógeno sólo sobre la superficie. Éstas se disponen entre las papilas y sobre los granos de polen que se encuentran en la superficie.

###### ESTILO:

El desarrollo de micelio es muy escaso, solamente se ha visto en presencia de granos de polen y sobre la superficie. No se observó crecimiento dentro de los tejidos. A diferencia de lo observado en la otra variedad no se ha visto ni colapso ni coloración rojiza en los tejidos. Hay desarrollo hasta el cuarto superior de esta pieza.

###### OVARIO:

No hay desarrollo de micelio.

#### **ANTERAS:**

Hay una marcada proliferación de micelio asociado con la presencia de granos de polen que se encuentran tanto dentro del tubo formado por las anteras como fuera de él, siendo mayor en el interior, tal vez relacionado con el hecho de presentar mayor cantidad de polen. El desarrollo más denso se observa en el primer cuarto de esta pieza; pero alcanza la mitad de la superficie de las anteras.

En la superficie exterior: el desarrollo es más abundante en el cuarto superior; pero alcanza hasta la mitad de la corola, siendo menos denso en esta zona de las anteras.

En la superficie interior: la proliferación es mayor a la observada en el exterior y está intimamente ligado con la presencia de granos de polen. A diferencia de lo observado en la superficie externa, aquí el crecimiento es continuo y en forma más densa y homogénea, abarcando la mitad del largo total.

En ninguna de las flores observadas se ha producido la penetración de los tejidos de las anteras.

#### **FILAMENTOS DE LOS ESTAMBRES:**

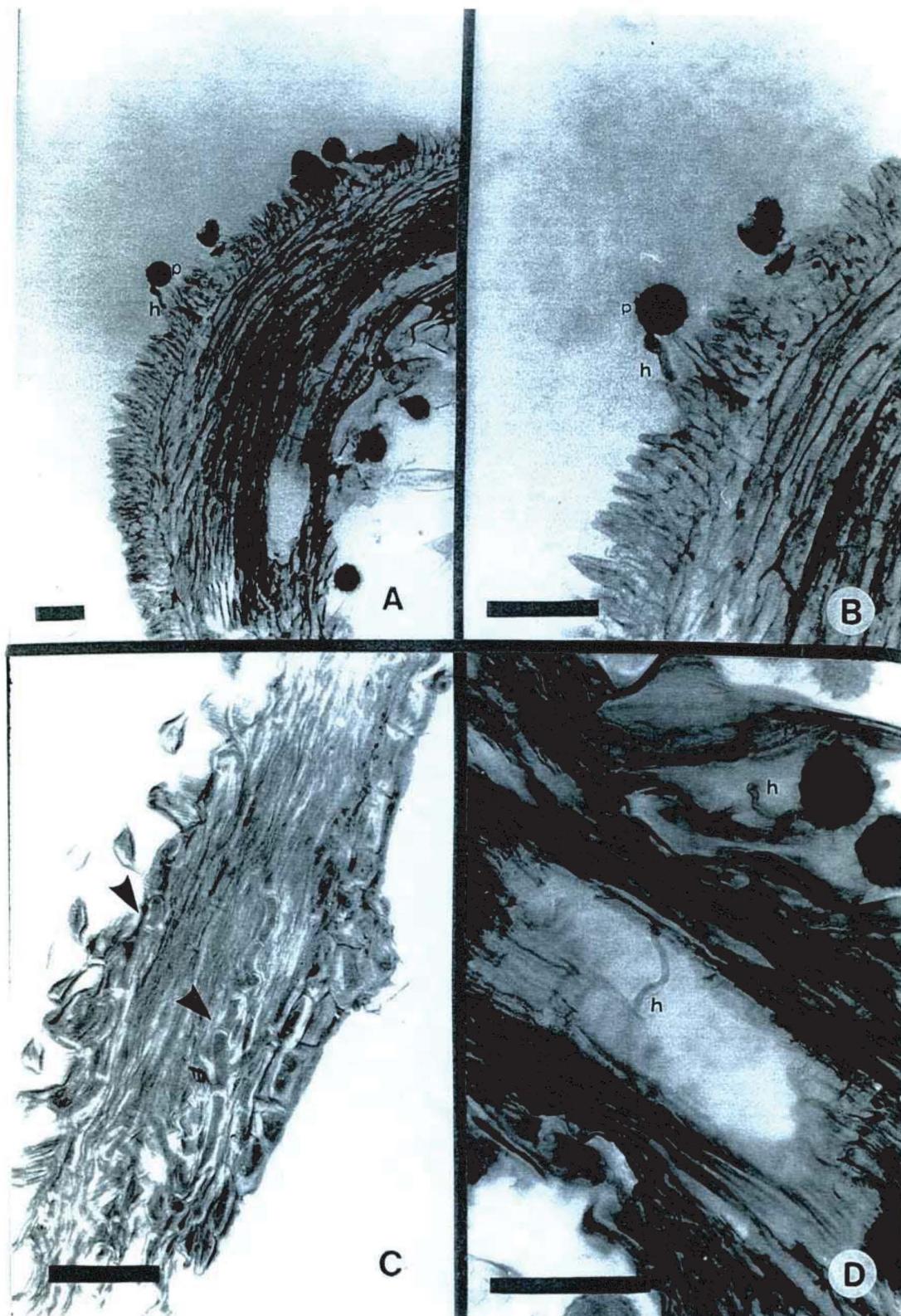
No se ha producido suficiente proliferación de micelio como para alcanzar a desarrollarse en esta región.

#### **TIEMPO 2:**

#### **COROLA:**

El desarrollo de micelio se produce en ambas superficies y también se ha visto la proliferación dentro de los tejidos.

El desarrollo en la superficie exterior no es mucho mayor en cuanto a la porción de la corola abarcada por el micelio al observado en el t1. Se observó crecimiento hasta la porción superior.. En este caso el desarrollo es mucho más denso y en muchos casos se encuentra asociado a la presencia de polen.



**Fig. 1.4 A-D** Fotomicrografía c/ MO: **A**, vista longitudinal de rama estigmática en la V HA 302 (VT) en t1, con incipiente desarrollo del patógeno. **B**, detalle. **C**, CL de rama estigmática de v HA 302 (VT) en t3. Desarrollo de hifas (flecha) en su interior con coloración rosada en los tejidos del estigma y del micelio. **D**, CL de rama estigmática de V HA 302 (VT) en t3. Micelio en superficie y en el interior de los tejidos, se puede observar hifa atravesando el canal estigmático. La misma se colorea rosada, el tejido del estigma se colorea de rojo (safranina). h: hifa; p: polen. Esc.: 60 $\mu$ m.

En cuanto a la superficie interior el crecimiento es mayor al observado en el tiempo 1, encontrándose desarrollo abundante de micelio, alcanzando 2/3 de su longitud, sin embargo el crecimiento sobre esta superficie no es continuo.

En una de las flores muestradas puede observarse el desarrollo de micelio dentro de los tejidos, en este caso es muy escaso y provoca la rotura de las células. Además en las células que rodean la zona atacada hay una ligera coloración rojiza-violácea, a diferencia del resto que se colorea de celeste.

#### PAPUS:

No se detectó presencia del patógeno.

#### ESTIGMA:

El desarrollo de micelio se observa sólo sobre la superficie y en muchos casos también en presencia de granos de polen. Se observaron algunas células coloreadas de rojo, pero ésta coloración no es generalizada, se observa fundamentalmente en las células que rodean el canal estigmático. En algunos casos puede observarse cierto colapso en las papilas, pero en éstos casos, a diferencia de la V HA 302, se colorean de color celeste.

#### ESTILO:

El crecimiento de micelio alcanza las 2/3 partes en la superficie. En dos de las flores puede observarse el colapso en los tejidos en la porción superior del estilo, por debajo de la zona con colapso se puede observar la invasión de los tejidos. En estos casos no hay colapso marcado de los tejidos sino que es escaso y no homogéneo; de modo que queda clara la presencia de hifas dentro de los tejidos, sólo en las porciones no colapsadas. La proliferación alcanza a la mitad de esta pieza.

#### OVARIO:

No hay desarrollo de micelio en esta pieza floral.

## **ANTERAS.**

El desarrollo de micelio es muy marcado, encontrándose invasión de los tejidos.

Superficie externa: hay abundante micelio sobre todo entre los granos de polen y a lo largo de toda la superficie. El desarrollo es mayor fundamentalmente sobre la zona del conectivo, encontrándose hifas asociadas con la desorganización de esta zona de las anteras. El crecimiento alcanza hasta las  $\frac{3}{4}$  partes de su longitud.

Superficie interna: también hay abundante desarrollo de hifas del patógeno, sin embargo la superficie abarcada es menor a la observada en la superficie externa y no se da en forma continua.

Dentro de los tejidos como se mencionó anteriormente hay desarrollo de micelio. Éste se produce abarcando el cuarto superior, en este caso abarca la epidermis de las anteras (Fig. 1.1 A) y en una de las flores también hay invasión de los restos del endotecio. También crece dentro de la epidermis en la zona del conectivo y en algunas porciones este tejido se encuentra roto en presencia de micelio.

## **FILAMENTOS DE LOS ESTAMBRES:**

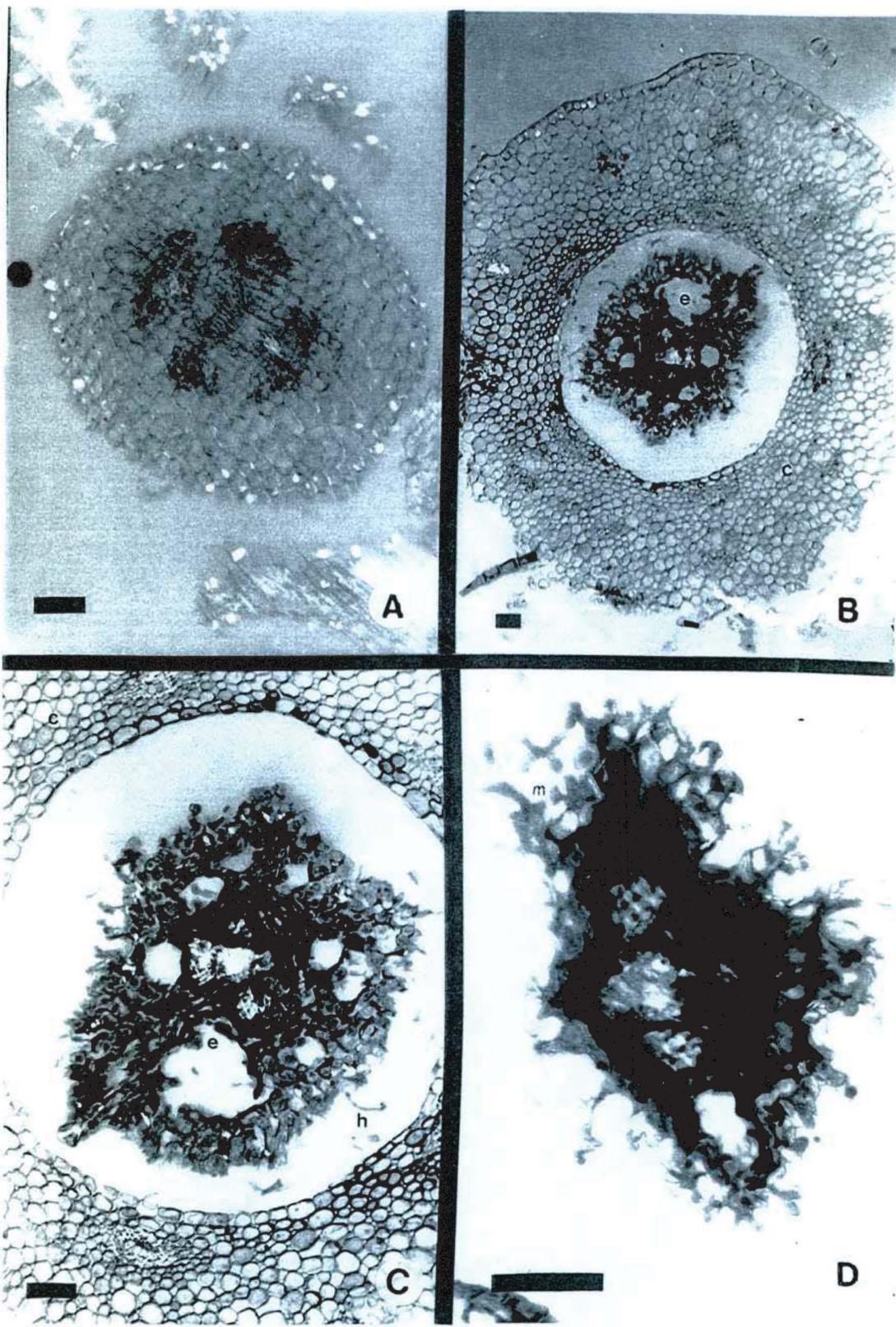
Se observa el desarrollo en superficie solamente y en una de las flores en el interior alcanzando el 1/3 superior.

## **TIEMPO 3:**

### **COROLA:**

El desarrollo de micelio del patógeno es muy profuso. Si bien puede observarse su presencia en superficie, el desarrollo en el interior de esta pieza floral es muy importante.

Superficie externa: el desarrollo de hifas del patógeno se observa casi en la mitad superior de esta pieza en forma continua, por debajo de ellas se observa escasamente.



**Fig. 1.5 A-D** Fotomicrografía c/ MO: **A**, CT de estilo de la V HA 89 (VS) en t3 (testigo). **B**, CT de corola y estilo de V HA 89 (VS). Desarrollo profuso de micelio con oscurecimiento y colapso principalmente en la zona central y degradación del tejido. **C**, detalle. **D**, CT de estilo en su parte media de V HA 89 (VS) notablemente invadido por micelio sobre todo en el tejido periférico. Colapso y oscurecimiento en la zona central. e: estílo; c: corola; h: hifa; m: micelio. Flecha: indica presencia de hifa. Esc.: 60 $\mu$ m.

**Superficie interna:** el desarrollo es mayor que en la externa , abarcando casi la totalidad de su longitud y en forma continua.

En el interior el desarrollo es muy importante, encontrándose crecimiento sobre todo entre las células y posiblemente dentro de ellas, alcanzando más de las  $\frac{3}{4}$  partes. Estas hifas se caracterizan por poseer mayor diámetro y con el contenido citoplasmático más denso que las que crecen en superficie. Puede llegar a observarse el colapso de algunas células; pero que se colorean con fast green (celeste) y si bien puede verse algo de coloración rojiza o bien algo violácea asociada con algunas hifas, ésta es escasa, no presenta mayores diferencias con respecto a la planta testigo, ya que mayormente la coloración de los mismos es celeste.( Fig. 1.6 B). Es interesante notar la presencia de cristales de tipo drusas. También asociada con ellos se observan hifas (Fig. 1.6 D).

En algunos de los cortes se observó que en presencia de hifas en superficie hay colapso de las papilas y coloración oscura en los tejidos adyacentes.

Hay invasión de los tejidos parenquimáticos (Fig. 1.6 C y E); pero también abarcando el tejido vascular, en ciertos sectores, donde además se pueden observar los cristales antes mencionados.

#### **ESTIGMA:**

El crecimiento de micelio es abundante en la superficie y también hay desarrollo dentro de los tejidos; en este caso también como en la VT puede observarse el colapso de algunos de los sectores de esta pieza con el oscurecimiento del contenido celular. También se observa presencia de cristales; pero en mucha menor proporción que en corola.

#### **ESTILO:**

En la porción superior se detecta el colapso de los tejidos abarcando la mitad superior; este es suficientemente importante y no se puede determinar si hay o no hifas en su interior, por debajo de esta porción el tejido presenta menor grado de colapso y se ve la presencia de micelio en su interior, no así en ciertos sectores donde el colapso

es mayor. El crecimiento de micelio alcanza prácticamente todo el estilo (Fig. 1.5 B-D), llegando hasta la zona de inserción con el ovario en una de ellas. Además a veces puede verse obstrucción de los elementos de vaso del xilema, que se colorea de rojo.

#### OVARIO:

Se observa el crecimiento de micelio en la porción superior del ovario de una de las flores observadas, abarcando aproximadamente 1/8 de su longitud total..

#### ANTERAS:

El desarrollo de micelio es muy abundante, tanto en la superficie como en el interior de las células de la epidermis, como en el endotecio y conectivo, abarcando toda la longitud de esta pieza floral (Fig. 1.1 B). También puede observarse presencia de cristales en el interior de los tejidos, como los observados en las otras piezas florales.

#### FILAMENTOS DE LOS ESTAMBRES:

También se observa abundante micelio tanto en superficie como en el interior, abarcando la totalidad de los mismos en 2 de ellas. La 3º no presenta desarrollo en la mitad inferior de esta pieza a veces se observa el colapso de los tejidos pero en forma discontinua y sin cambio en la coloración con respecto a las flores testigo. También hay cristales; pero en menor proporción.

Las observaciones se resumen en la tabla 1.2.

En el primer tiempo de muestreo, si bien hay poco desarrollo de micelio, éste está íntimamente ligado a los granos de polen. En la corola la coloración rojiza en presencia de hifas, sólo puede ser observada en la VT. De la misma manera si bien el crecimiento en pistilo es sobre la superficie, en una de las flores de VT se detecta el colapso de las células y la tinción roja ya mencionada. En cuanto a las anteras hay un desarrollo semejante en las dos variedades, estando el mismo muy asociado con la presencia de granos de polen.

En cuanto al segundo tiempo de muestreo en la corola la superficie abarcada por el micelio es mayor en la VS, donde además se produce el ingreso dentro de los tejidos,

sólo en la periferia de la zona atacada hay algo de coloración rojiza. En cuanto al estigma hay colapso de las papilas con coloración celeste en la VS y rojiza en la VT, en el estilo el colapso es notable en la VT, sin embargo también puede presentarse en la VS; pero abarcando un sector más pequeño y con mucha menor magnitud de modo que inclusive permite detectar micelio en el interior de los tejidos. En las anteras el desarrollo es notablemente mayor en el segundo tiempo que en el primero en las dos variedades; pero superior en la VS, hay a veces roturas de los tejidos relacionadas con la presencia de hifas en superficie, pero hay escaso desarrollo intratísular, encontrándose sobre todo en la epidermis.

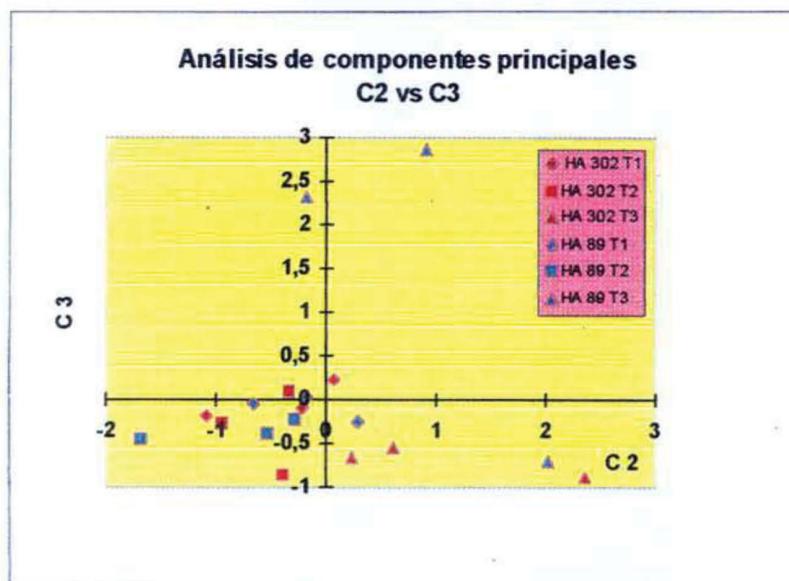
	Variedad HA 302			Variedad HA 89		
	t1	t2	t3	t1	t2	t3
Corola	Escaso, sólo en superficie. Asociación con granos de polen. Coloración rojiza en las células en presencia de hifas	Crecimiento sólo en superficie. Superficie interna 1/2 superior. Superficie externa hasta el 1/4 superior.	Crecimiento hasta 1/4 en superficie y 1/3 dentro de los tejidos.	Escaso, sólo en superficie, en el 1/4 superior. Con desarrollo mayor en el interior.	Crecimiento en superficie dentro del 1/4 superior, pero en forma más densa que en t1. Desarrollo en el interior hasta el 2/3 superior.	Desarrollo hasta la 1/2 en la superficie externa y 3/4 partes en la superficie interna y en el interior. Colapso menor y con coloración celeste.
Estigma	Desarrollo en superficie y asociada con polen.	Sólo en superficie. Hay coloración rojiza con cierto colapso de las papilas.	Desarrollo en superficie y en el interior de los tejidos. Coloración rojiza.	Desarrollo en superficie y asociado con granos de polen.	Crecimiento sólo en superficie, hay colapso en las papilas, con coloración celeste.	Desarrollo en superficie e interior. Algo de oscurecimiento en las paredes de las células y presencia de cristales.
Estilo	Crecimiento en superficie en la 1/4 parte superior, muchas veces con polen.	Desarrollo en la 1/3 parte en superficie. Colapso en ciertas zonas. Crecimiento más denso en una de las flores.	Desarrollo hasta la 1/2 superior y también en el interior (1/3). Colapso en la 1/2 superior.	Crecimiento en superficie, hasta el 1/4 superior. No se ve colapso ni coloración rojiza.	Crecimiento en superficie abarcando 2/3 de su longitud. Dos de las flores con penetración. Desarrollo hasta la mitad de la pieza.	Colapso hasta la 1/2,. Desarrollo dentro de los tejidos abarcando prácticamente todo el estilo.

Ovario	-	-	-	-	-	Sólo en el interior en una de las flores (1/8 de su longitud)
Papus	-	-	-	-	-	-
Anteras	Sólo en superficie en el ¼ superior.	Abundante desarrollo, más en la superficie exterior. Conectivo roto asociado con hifas. Desarrollo de hifas en la epidermis dentro del ¼ superior.	Totalmente atacadas. Crecimiento en el interior y en superficie.	Desarrollo en ambas superficies, mayor en la interna. Asociado con granos de polen. Abarca el ¼ superior en forma más densa, llegando hasta la mitad de ella	Desarrollo en ambas superficies siendo mayor en la externa. En el interior el crecimiento no es continuo. Abundante en la zona del conectivo.. Desarrollo en superficie (3/4 partes) y en el interior (1/4).	Abundante desarrollo tanto en superficie como en el interior a lo largo de toda su longitud.
Filamento	-	-	Crecimiento en superficie y en el interior alcanzando hasta la mitad de las piezas.	-	Desarrollo en superficie, en una de las flores hay desarrollo en el interior dentro del 1/3 superior.	Desarrollo tanto fuera como dentro a lo largo de toda su longitud, excepto una de las flores que no tiene desarrollo en la mitad inferior.

Tabla 1.2. Desarrollo del micelio del patógeno en las piezas florales para las dos variedades y en los tres tiempos.

En el tercer tiempo ambas variedades tienen considerable desarrollo de micelio. En la corola el crecimiento en ambas superficies es mayor en la VS y en ella también hay mayor desarrollo dentro de los tejidos ya que abarca ¾ partes de su longitud total. En la VS también se observa la formación de cristales en las flores atacadas que no se ve en la VT, donde la corola se caracteriza por colorearse de rojo en su mayor parte, incluso muy intenso en ciertas zonas y presenta un marcado colapso y necrosis de sus tejidos. En estilo hay desarrollo del patógeno en las dos variedades y también colapso de los tejidos; pero que es mayor en la VT en la que la porción de tejido atacada es menor a la de la VS. En ella si bien se produce algo de colapso de los tejidos éste abarca sólo la parte

superior y el patógeno se desarrolla por debajo de ella.



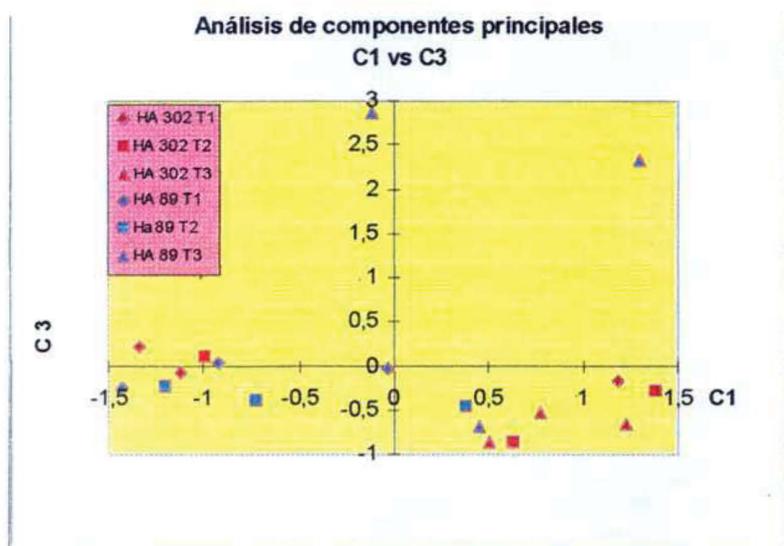
**Gráf. 1.1- Distribución de las muestras analizadas en el espacio de los componentes C2 y C3.**

### 1.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

En el análisis de componentes principales (ACP), los primeros 5 componentes derivados del análisis efectuado sobre la matriz de presencia-ausencia del patógeno (48 variables x 18 muestras) explicaron el 79.10 % de la variación entre las muestras en relación a la presencia-ausencia en los diferentes sitios observados (variables). Las contribuciones de los espacios puede observarse en la Tabla 1.3.

El componente 1 muestra la segregación de 9 muestras, 5 de ellas corresponden al t3 (3 de la variedad tolerante y 2 de la susceptible), 3 muestras de t2 (2 de la variedad tolerante y 1 de la susceptible) y 1 muestra de t1 tolerante; estas muestras están localizadas sobre el extremo positivo del componente 1 y se caracterizan por la presencia del patógeno en: Est 1° ext, A3° int, A 4° ext, A 4° int.

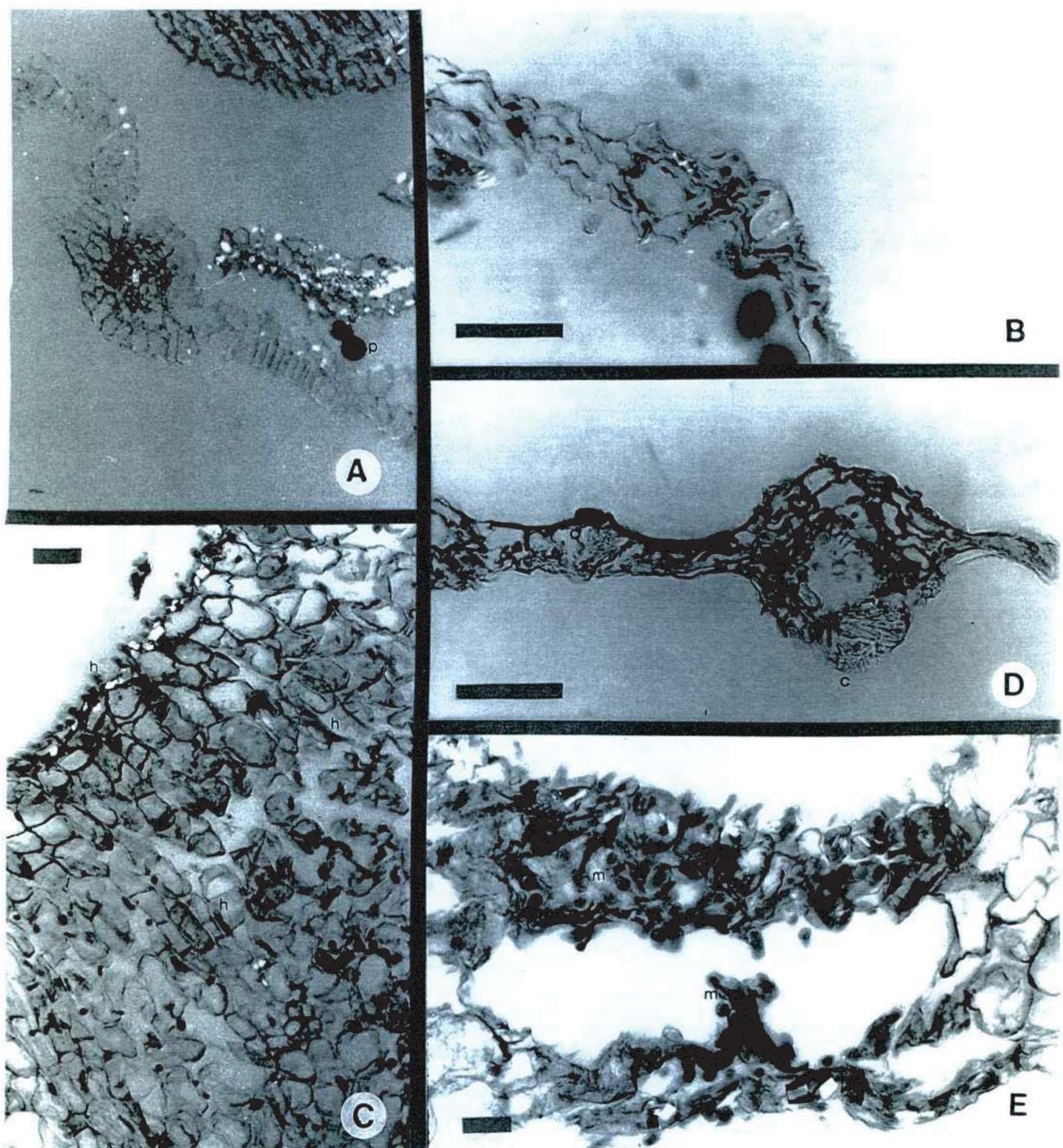
El componente 2 muestra la segregación de 7 muestras, 5 de ellas corresponden al t3 (3 de la variedad susceptible y 2 de la tolerante), 2 de t1. Estas muestras están ubicadas en el extremo positivo del componente 2 y están caracterizadas por la presencia del patógeno dentro de los tejidos de distintos sectores de la corola (C 1° d, C2° d, C3° d, C 4° d) A 2° d y Est. int. En el extremo negativo de este componente se ubican 10



**Gráf. 1.2-** Distribución de las muestras analizadas en el espacio de los componentes C1 y C3

muestras correspondientes a t1 y t2 de las 2 variedades. Estos tiempos se caracterizan por la ausencia del patógeno dentro de los tejidos de la corola.

El componente 3 (Gráf. 1.1 y 1.2) segregá claramente dos muestras del t3 de la HA 89 (VS). Dichas muestras se ubican en el extremo positivo del componente y están caracterizadas por la presencia del patógeno en: estilo 2° interior, filamento 2° exterior, filamento 2° interior, estilo 5° interior y ovario interior. De manera que, tal como se describió las principales diferencias en el comportamiento de las variedades se observan en el t3, en donde el avance del patógeno es notablemente mayor en VS, llegando a colonizar las porciones inferiores de los filamentos y del estilo (también de la corola aunque esta no tiene tanto aporte como las porciones mencionadas en este componente).



**Fig. 1.6 A-E** Fotomicrografía c/ MO: **A**, CT de corola de testigo en t3. **B**, CT de corola de V HA 89 (VS) con ligero colapso y desarrollo de hifas en su interior. **C**, CT de corola de V HA 89 (VS) con abundante crecimiento de hifas en su interior y degradación del tejido. **D**, CT de corola de V HA 89 (VS) con desarrollo profuso de micelio en su interior. Hay ligero colapso celular y presencia de cristales. **E**, CT de corola de V HA 89 (VS) con abundante desarrollo de micelio y degradación de los tejidos. En todos los casos los tejidos y el micelio se colorean con fast green (tonos azules). h: hifa; p: polen; c: cristales; m: micelio. Esc: 60 $\mu$ m

Variable	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4	Componente 5
Est ext	0.436	0.152	0.093	0.157	-0.718
Est int	0.373	0.727	0.393	0.236	0.097
Est 1° ext	0.904	0.139	0.072	0.224	-0.152
Est 1° int	0.480	0.610	0.012	-0.206	0.166
Est 2° ext	0.760	-0.015	0.274	0.410	0.070
Est 2° int	0.216	0.132	0.945	0.030	0.089
Est 3° ext	0.489	0.231	0.343	0.583	0.220
Est 3° int	0.357	0.213	0.702	0.137	0.446
Est 4° ext	0.251	0.421	0.690	0.250	-0.004
Est 4° int	0.206	0.254	0.161	0.915	0.046
Est 5° int	-0.029	0.225	0.716	0.329	0.063
Ov int	-0.029	0.225	0.716	0.329	0.063
A 1° ext	0.250	0.101	0.173	0.711	0.207
A 1° d	0.532	0.500	0.229	0.432	0.242
A1° int	0.449	0.236	0.027	0.228	0.697
A 2° ext	0.460	0.288	0.121	0.314	0.622
A2° d	0.503	0.720	0.293	0.141	0.182
A 2° int	0.773	0.032	0.259	0.061	0.142
A 3° ext	0.625	0.109	0.006	0.170	0.567
A 3° d	0.649	0.252	0.054	0.187	0.585
A3°int	0.904	0.139	0.072	0.224	-0.152
A 4° ext	0.823	0.154	0.031	0.273	0.195
A 4° d	0.649	0.585	0.252	0.054	0.187
A 4° int	0.823	0.154	0.031	0.273	0.195
Fil 1° ext	0.774	0.448	0.227	-0.010	0.034
Fil 1° int	0.503	0.720	0.293	0.141	0.182
Fil 2° ext	0.216	0.132	0.030	0.089	0.945
Fil 2° int	0.132	0.945	0.030	0.089	0.216
C 1° ext	0.098	0.659	-0.143	0.211	0.098
C 1° d	0.129	0.810	0.199	0.256	-0.080
C 1° int	-0.029	0.643	0.232	-0.009	0.402
C 2° ext	-0.004	-0.125	0.521	0.235	0.456
C 2° d	0.129	0.810	0.199	0.256	-0.080
C 2° int	0.766	0.370	0.221	-0.061	-0.088
C 3° ext	0.242	0.670	0.377	0.132	0.265
C 3°d	0.104	0.413	0.003	0.222	0.808
C 3° int	0.739	0.384	0.131	-0.108	0.073
C 4° ext	-0.153	0.460	0.367	0.0384	0.292
C 4° d	0.373	0.727	0.393	0.236	0.097
C 4°int	0.430	0.645	0.270	0.214	-0.039
C 5° ext	0.196	0.297	-0.282	0.251	-0.291
C5° d	0.206	0.254	0.161	0.915	0.046
C5° int	0.357	0.213	0.446	0.702	0.137
%VC	10.249	9.002	6.255	5.243	3.267

**Tabla 1.3.** Aporte de las variables para cada uno de los componentes y el porcentaje de la varianza (%V) que explica cada uno de ellos.

## PARTE II

### OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS AISLADAS A PARTIR DE ANTÓSFERA. SELECCIÓN DE ANTAGONISTAS.

#### 2.1 Identificación de las cepas y determinación de sus frecuencias.

Las únicas especies presentes en las dos variedades son: a) *Alternaria alternata* cuya frecuencia en variedades susceptibles (VS) y en variedades tolerantes (VT) es significativamente diferente siendo 2,86 y 7,71 respectivamente. En variedades susceptibles se ha encontrado en anteras y también en estigma de sólo una de ellas; mientras que en variedades tolerantes se halló en papus, corola (C1), estigma, antera y ovario y b) *Cladosporium cladosporioides* también tiene frecuencias muy diferentes siendo tres veces mayor en VS, donde tiene 18,57%, contra 6,17% en VT. En variedades susceptibles tanto como en variedades tolerantes fue aislado desde todas las piezas florales. En la tabla 2.1 se detallan las especies fúngicas aisladas a partir de las variedades susceptibles y tolerantes con sus respectivas frecuencias totales.

El número de especies fúngicas obtenidas en VS es de sólo 10 y corresponden a 42 cepas aisladas a partir de 140 trozos de piezas totales sembradas. En variedades tolerantes se han obtenido 118 cepas pertenecientes a 29 especies fúngicas; y que han sido aisladas a partir de un total de 350 trozos de piezas sembrados. Con lo que el número de cepas obtenidas por pieza floral corresponde a 0.30 cepas/ trozo en VS y 0.34 cepas/ trozo en VT. De modo que tanto el grado de colonización como la variabilidad específica (23.8 en VS y 24.5 en VT) es similar en VT y VS.

Las especies como: *C. cucumerinum*, levadura MC, *Penicillium sp 1* y *Penicillium sp 2* constituyen pobladores exclusivos de VS con frecuencias muy bajas: 0,71%, en todos los casos, por otro lado la levadura MC, *Penicillium sp 1* sólo fue encontrado en la variedad HA 300, mientras que *Penicillium sp 2* y *C. cucumerinum* fue encontrado sólo en la variedad Z 20028.

Especie fungica	Variedades Susceptibles			Variedades Tolerantes				
	HA 300	Z 20028	Total	Z AV84-10	Z 20018	Z 30629	HA302	Total
<i>Alternaria alternata</i>	1.43	4.29	2.86	4.76	5.71	12.38	6.67	7.71
<i>Alternaria cheiranti</i>	0	0	0	0	0	0	0.95	0.29
<i>Alternaria citri</i>	0	4.29	2.14	2.86	0	6.67	4.76	4.29
<i>Alternaria clamydospora</i>	0	0	0	1.9	0	5.71	0.95	2.57
<i>Alternaria radicini</i>	0	0	0	0	0	0.95	0	0.29
<i>Alternaria raphani</i>	0	2.86	1.43	0	2.86	0.95	0.95	0.86
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	17.14	21.43	18.57	5.71	5.71	4.76	9.52	6.57
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	0	1.43	0.71	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	0	0	0.95	0	0	0	0.29
<i>Dreschlera indica</i>	0	0	0	0	0	0	0.95	0.29
<i>Epicoccum purpurascens</i>	2.86	0	1.43	0	0	5.71	0	1.71
<i>Fusarium graminearum</i>	0	0	0	4.76	0	3.81	0.95	2.57
<i>Fusarium nivale</i>	0	0	0	0	8.57	0	0	0.86
<i>Fusarium sambucinum</i>	0	1.43	0.71	0.95	0	2.86	0	1.14
Indeterminada I	0	0	0	0	0	0	0.95	0.29
Indeterminada II	0	0	0	0	0	0	0.95	0.29
Indeterminada III	0	0	0	0	0	0.95	0	0.29
Levadura AB	0	0	0	0	0	0.95	0	0.29
Levadura AC	0	0	0	0	0	0	0.95	0.29
Levadura ACII	0	0	0	0	0	0.95	0	0.29
Levadura AM	0	0	0	0	0	0	0.95	0.29
Levadura C	0	0	0	0.95	0	0	0	0.29
Levadura M	0	0	0	0	0	0	0.95	0.29
Levadura MC	1.43	0	0.71	0	0	0	0	0
<i>Penicillium sp 1</i>	1.43	0	0.71	0	0	0	0	0
<i>Penicillium sp 2</i>	0	1.43	0.71	0	0	0	0	0
<i>Penicillium sp 3</i>	0	0	0	0.95	0	0	0	0.29
<i>Penicillium sp 4</i>	0	0	0	0.95	0	0	0	0.29
<i>Penicillium sp 5</i>	0	0	0	0.95	0	0	0	0.29
<i>Penicillium sp 6</i>	0	0	0	0.95	0	0	0	0.29
<i>Penicillium sp 7</i>	0	0	0	0.95	0	0	0	0.29
<i>Penicillium sp 8</i>	0	0	0	0	0	0	0.95	0.29
<i>Phoma glomerata</i>	0	0	0	0.95	0	0	0	0.29

TABLA 2.1- Frecuencias totales de las especies fungicas aisladas por el método de lavado de la "antosfera".

Fueron encontradas como especies exclusivas de VT *A. cheiranti*, *A. clamydospora*, *A. radicini*, *C. sphaerospermum*, *D. indica*, *F. graminearum*, *F. nivale*, *P. glomerata*, varias especies de levaduras y 3 especies pertenecientes a especies indeterminadas. Entre ellos las mayores frecuencias las presentan: *A. clamydospora* y *F. graminearum* con frecuencias del 2,57%. Ambas especies encontradas en todas las VT con excepción de la variedad Z 20028.

Dentro de las VS sólo *A. alternata* y *C. cladosporioides* fueron aislados en ambas variedades. Las restantes especies fueron aisladas sólo de una de ellas.

Dentro de las VT *A. citri*, *A. clamydospora*, *A. raphani* y *F. graminearum* se encontraron en tres de ellas.

Por otra parte la mayoría las especies de *Penicillium* fueron aisladas de la V Z AV84-10 y a partir de todas las piezas florales con excepción de la corola (C1) y de nectario mientras que *Penicillium sp* 8 obtenido a partir de antera de V HA 302.

La mayoría de las especies de levaduras y de *Penicillium sp* provienen de VT. Se obtuvieron 6 especies de levaduras en VT y 1 de VS y de *Penicillium* se aislaron 6 especies de VT y 2 de VS obtenidas desde las diferentes variedades. Las especies de levaduras se encuentran en 1,71 % en VS y 1,74 % en VT. *Penicillium sp* se encontró con una frecuencia de 1.74% en VT y en VS de 1.42%.

## 2.2 FRECUENCIA DE LAS ESPECIES FÚNGICAS DISCRIMINADA POR VARIEDAD Y POR PIEZA FLORAL.

### 2.2.1 VARIEDADES SUSCEPTIBLES (VS):

En la variedad HA 300 se encontraron un total de 17 cepas de hongos pertenecientes a 5 especies, mencionadas en la tabla 2.2.

La especie más frecuente fue *C. cladosporioides* con un 17.14% superando

enormemente a las restantes. Este hongo ha sido aislado a partir de todas las piezas florales muestreadas, encontrándose más frecuentemente en antera (30%), en estigma (20%) y en palea (20%).

Especie fúngica	P	Pap.	C1	C2	E	A	O	N	Total	% de antagonistas
<i>A. alternata</i>	0	0	0	0	0	10	0	0	1.43	0
<i>C. cladosporioides</i>	20	10	10	10	20	30	10	10	17.1	33.33
<i>E. purpurascens</i>	0	0	0	0	20	0	0	0	2.86	100
<i>Penicillium sp 1</i>	0	0	0	0	10	0	0	0	1.43	0
Levadura MC	0	0	0	0	0	0	10	0	1.43	0
Microorg. totales	20	10	10	10	50	40	20	10		35.29

**Tabla 2.2:** frecuencias de las especies fúngicas aisladas a partir de la variedad HA 300 (VS), en las distintas piezas florales y el porcentaje de cepas antagonistas de cada una de ellas. P: palea. Pap: papus C1 y C2: corola. A: antera. O: ovario. N: nectario.

Por otra parte, con respecto a las piezas florales el estigma de esta variedad es la que presenta mayor frecuencia de microorganismos, con un 50% de presencia y es seguida por la antera con un 40%.

Especie fúngica	P	Pap.	C1	C2	E	A	O	N	Total	% de antagonistas
<i>A. alternata</i>	10	0	0	0	10	10	0	0	4.29	66.67
<i>A. citri</i>	0	0	20	0	0	10	0	0	4.29	66.67
<i>A. raphani</i>	10	10	0	0	0	0	0	0	2.86	50
<i>C. cladosporioides</i>	10	20	30	0	30	30	10	20	21.4	6.67
<i>C. cucumerinum</i>	0	0	10	0	0	0	0	0	1.43	0
<i>F. sambucinum</i>	0	0	0	0	0	10	0	0	1.43	100
<i>Penicillium sp 2</i>	0	0	0	0	0	0	10	0	1.43	100
Microorg. totales	30	30	50	0	40	60	20	20		28

**Tabla 2.3:** frecuencias de las especies fúngicas aisladas a partir de la variedad Z 20028 (VS), en las distintas piezas florales y el porcentaje de cepas antagonistas de cada una de ellas. P: palea. Pap: papus C1 y C2: corola. A: antera. O: ovario. N: nectario.

En la variedad Z 20028 se obtuvo un total de 25 cepas fúngicas que pertenecen a 7 especies de hongos. La especie con mayor frecuencia fue *C. cladosporioides*, cuyo valor llega al 21.43% superando ampliamente a las restantes. Ésta ha sido aislada a partir

de todas las piezas florales como se indica en la Tabla 2.3; con excepción de corola (C2) que no fue sembrada en esta variedad. Las mayores frecuencias se encuentran en corola (C1): 30%, estigma: 30% y antera: 30%.

Otras especies destacadas son: *A. alternata* que presenta una frecuencia de 4.29% y fue aislada tanto de palea como de estigma y antera. *A. citri* con la misma frecuencia total: 4.29% y que fue aislado desde corola (C1) y antera. Las restantes especies se encuentran en menor frecuencia.

Con respecto a las piezas florales, las que presentan mayor porcentaje de especies fúngicas son las anteras con un 60%, seguidas por la corola (C1) con un 50% y estigma con 40%.

#### 2.2.2 VARIEDADES TOLERANTES (VT):

La variedad Z AV84-10 presenta un mayor número de especies fúngicas aisladas en relación con las otras variedades. Se obtuvieron 30 cepas pertenecientes a 14 especies, que están indicadas en la tabla 2.4.

*C. cladosporioides* presenta mayor frecuencia alcanzando el 5.71%, presente más frecuentemente en la corola donde alcanza el 20%, también fue aislado desde estigma (13.33%) y antera (6.67%).

*F. graminearum* y *A. alternata* poseen una frecuencia total del 4.76%. En el caso de *A. alternata* fue aislado desde estigma con una frecuencia del 20%, antera (6.67%) y ovario (6.67%); mientras que *F. graminearum* se obtuvo sólo desde estigma (13.3%) y antera (20%). Las especies restantes se encuentran en frecuencias mucho menores.

Especie fúngica	P	Pap.	C1	C2	E	A	O	N	Total	% de antagonistas
<i>A. alternata</i>	0	0	0	0	20	6.67	6.67	0	4.76	80
<i>A. citri</i>	6.67	0	6.67	0	6.67	0	0	0	2.86	100
<i>A. clamydospora</i>	0	0	6.67	0	0	6.67		0	1.9	0
<i>C. cladosporioides</i>	0	0	20	0	13.3	0	6.67	0	5.71	50
<i>C. sphaerospermum</i>	0	0	6.67	0	0	0	0	0	0.95	0
<i>F. graminearum</i>	0	0	0	0	13.3	20	0	0	4.76	40
<i>F. sambucinum</i>	0	0	0	0	0	6.67	0	0	0.95	100
Levadura C	0	0	0	0	0	0	0	6.67	0.95	0
<i>Penicillium sp 3</i>	0	6.67	0	0	0	0	0	0	0.95	100
<i>Penicillium sp 4</i>	6.67	0	0	0	0	0	0	0	0.95	0
<i>Penicillium sp 5</i>	0	0	0	0	0	0	6.67	0	0.95	100
<i>Penicillium sp 6</i>	0	0	0	0	0	6.67	0	0	0.95	0
<i>Penicillium sp 7</i>	0	0	0	0	0	6.67	0	0	0.95	100
<i>Phoma glomerata</i>	0	0	0	0	6.67	0	0	0	0.95	0
Totales	20	6.67	26.6	0	53.3	46.7	20	6.67		50

Tabla 2.4: frecuencias de las especies fúngicas aisladas a partir de la variedad Z AV84-10 (VT), en las distintas piezas florales y el porcentaje de cepas antagonistas de cada una de ellas. P: palea. Pap: papus C1 y C2: corola. A: antera. O: ovario. N: nectario.

Las piezas florales con mayor porcentaje de especies fúngicas son: estigma con un 53.34%, encontrándose *A. alternata*, *A. citri*, *C. cladosporioides*, *F. graminearum* y *P. glomerata*; seguida por la antera cuyo porcentaje es 46.7% que también presenta entre sus pobladores a: *A. alternata*, *A. clamydospora* y *F. graminearum*, además de *F. sambucinum* y 2 especies de *Penicillium*.

Nectario y papus son las piezas que presentan menores frecuencias. En esta variedad no se ha realizado siembra de trozos de C2.

En la variedad Z 20018 (Tabla 2.5)se obtuvieron 8 cepas pertenecientes a 4 especies. *F. nivale* es la que se encuentra con mayor frecuencia con un porcentaje total del 8.57% y que fue aislada desde la antera en un porcentaje del 40% y de ovario con el 20%.

Con respecto a las restantes piezas florales no se obtuvo ningún aislamiento a partir de papus y de nectario (cabe aclarar que en esta variedad no se sembró la pieza C2). Las que presentan porcentajes mayores son: corola (C1), estigma y antera en todos los casos con el 40%.

Especies fúngicas	P	Pap.	C1	C2	E	A	O	N	Total	% de antagonistas
<i>A. alternata</i>	0	0	0	0	40	0	0	0	5.71	100
<i>A. raphani</i>	0	0	20	0	0	0	0	0	2.86	100
<i>C. cladosporioides</i>	20	0	20	0	0	0	0	0	5.71	0
<i>F. nivale</i>	0	0	0	0	0	40	20	0	8.57	33.33
Totales	20	0	40	0	40	40	20	0		50

**Tabla 2.5:** frecuencias de las especies fúngicas aisladas a partir de la variedad Z 20018 (VT), en las distintas piezas florales y el porcentaje de cepas antagonistas de cada una de ellas. P: palea. Pap: papus C1 y C2: corola. A: antera. O: ovario. N: nectario.

En la variedad Z 30629 (tabla 2.6) se obtuvieron un total de 47 cepas pertenecientes a 12 especies; entre las mismas, la de mayor frecuencia es *A. alternata* con un 12.38%. Esta especie fue aislada de papus (6.67%), corola (26.67%), estigma (20%), antera (20%) y ovario (13.33%). No fue aislada de palea ni de nectario.

*A. citri* es la especie que le sigue de mayor frecuencia y fue aislada a partir de antera donde presenta la mayor frecuencia (20%), desde corola y estigma. Su frecuencia total alcanza el 6.67%.

Con una frecuencia del 5.71% se encuentran *A. clamydospora*, aislada desde corola (C1), antera y ovario y *E. Purpurascens*, aislado desde todas las piezas florales, excepto estigma.

Por otro lado los porcentajes totales de cada especie fúngica por pieza floral hallados en esta variedad son los mayores entre todas las variedades. Todas las piezas florales tienen valores totales que superan el 13%, siendo superiores las de antera (86.68%), corola (66.67%) y ovario (53.33%).

La pieza C2 no fue sembrada en esta variedad.

<b>Especie fúngica</b>	<b>P</b>	<b>Pap.</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>O</b>	<b>N</b>	<b>Total</b>	<b>% de antagonistas</b>
<i>A. alternata</i>	0	6.67	26.7	0	20	20	13.3	0	12.4	46.15
<i>A. citri</i>	0	0	13.3	0	13.3	20	0	0	6.67	85.71
<i>A. clamydospora</i>	0	0	13.3	0	0	6.67	20	0	5.71	83.33
<i>A. radicini</i>	0	0	0	0	6.67	0	0	0	0.95	100
<i>A. raphani</i>	0	0	0	0	0	6.67	0	0	0.95	100
<i>C. cladosporioides</i>	6.67	6.67	0	0	0	0	13.3	6.67	4.76	100
<i>E. purpurascens</i>	6.67	6.67	6.67	0	0	6.67	6.67	6.67	5.71	83.33
<i>F. graminearum</i>	0	0	0	0	13.3	6.67	0	0	3.81	100
<i>F. sambucinum</i>	0	0	6.67	0	0	13.3	0	0	2.86	100
Indeterminada III	0	0	0	0	6.67	0	0	0	0.95	100
Levadura AB	0	6.67	0	0	0	0	0		0.95	0
Levadura ACII	6.67	0	0	0	0	0	0	0	0.95	100
	20	26.7	66.7	0	60	86.7	53.3	13.3		76.59

**Tabla 2.6:** frecuencias de las especies fúngicas aisladas a partir de la variedad Z 30629 (VT), en las distintas piezas florales y el porcentaje de cepas antagonistas de cada una de ellas. P: palea. Pap: papus C1 y C2: corola. A: antera. O: ovario. N: nectario.

A partir de la variedad HA 302 (Tabla 2.7) se aislaron 33 cepas que pertenecen a 14 especies fúngicas. Entre ellas *C. cladosporioides*, es la que presenta mayor frecuencia total: 9.52 % y fue aislado desde palea, corola (C1y C2) y estigma, en esta última pieza se presenta con mayor frecuencia: 40%. Le sigue *A. alternata* con frecuencia del 6.67% y se encuentra más frecuentemente en palea (20%) y *A. citri* con 4.76% de frecuencia total y, cuya mayor frecuencia (20%) corresponde a la se halló en palea. Las demás especies se encuentran con frecuencias mucho menores (0.95%).

Con referencia a las piezas florales, las mayores frecuencias fueron encontradas en estigma con el 66.68% y en palea con el 60%. Mientras que no se obtuvieron aislamientos desde ovario ni desde nectario.

Especie fúngica	P	Pap.	C1	C2	E	A	O	N	Total	% de antagonistas
<i>A. alternata</i>	20	6.67	0	0	6.67	13.3	0	0	6.67	85.71
<i>A. cheiranti</i>	0	0	6.67	0	0	0	0	0	0.95	0
<i>A. citri</i>	20	0	0	0	6.67	6.67	0	0	4.76	60
<i>A. clamydospora</i>	6.67	0	0	0	0	0	0	0	0.95	100
<i>A. raphani</i>	0	0	0	0	6.67	0	0	0	0.95	100
<i>C. cladosporioides</i>	6.67	0	6.67	13.3	40	0	0	0	9.52	60
<i>D. indica</i>	6.67	0	0	0	0	0	0	0	0.95	100
<i>F. graminearum</i>	0	0	0	0	0	6.67	0	0	0.95	100
Levadura AC	0	0	6.67	0	0	0	0	0	0.95	100
Levadura AM	0	0	0	0	6.67	0	0	0	0.95	100
Levadura M	0	0	6.67	0	0	0	0	0	0.95	100
Indeterminada I	0	6.67	0	0	0	0	0	0	0.95	100
Indeterminada II	0	6.67	0	0	0	0	0	0	0.95	0
<i>Penicillium sp 8</i>	0	0	0	0	0	6.67	0	0	0.95	100
	60	20	26.7	13.3	66.7	33.3	0	0		75.76

Tabla 2.7: frecuencias de las especies fúngicas aisladas a partir de la variedad HA 302 (VT), en las distintas piezas florales y el porcentaje de cepas antagonistas de cada una de ellas. P: palea. Pap: papus C1 y C2: corola. A: antera. O: ovario. N: nectario.

### 2.3 SELECCIÓN DE ANTAGONISTAS:

Con el fin de establecer el antagonismo potencial hacia el patógeno *S. sclerotiorum* de las especies fúngicas aisladas de la antósfera, se realizaron cultivos duales en agar-malta, como se indica en 2.4.

Se consideraron los siguientes grados de reacción ( Gr R) de los diferentes pares cepa- *S. Sclerotiorum*, en base a la morfología y crecimiento en caja de Petri (Faifer & Bertoni, 1988):

D1: crecimiento de las colonias hasta ponerse en contacto con formación de una línea de demarcación recta y mezcla de micelios en la zona de interacción.

D2: crecimiento de una de las colonias rodeando a la otra con contacto entre las hifas.

D2++: crecimiento de una de las colonias rodeando a la otra y creciendo posteriormente

por encima de ella.

D3: crecimiento de una de las colonias rodeando a la otra sin contacto entre las hifas y  $d \leq 2$  mm.

D4: Inhibición mutua a una distancia  $< 2$  mm con línea de interacción recta entre las colonias.

D5: Inhibición unilateral a una distancia  $> 2$  mm.

Abreviatura empleada:

F: frecuencia de aparición para la especie mencionada.

Como puede observarse en las tablas 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 y 2.7 el porcentaje de cepas antagonistas encontradas en variedades susceptibles es menor que en variedades tolerantes. Esto se resume en la tabla 2.1.1.

% de antagonistas					
Variedades susceptibles		Variedades tolerantes			
HA 300	Z 20028	Z AV 84-10	Z 20018	Z 30629	HA 302
35.29 %	28 %	50 %	50%	76.59 %	75.76 %

Tabla 2.1.1: % de cepas antagonistas presentes en las variedades

Del estudio de antagonismo en las variedades estudiadas pudo observarse lo siguiente (donde se indica D2 , salvo cuando se aclara, la colonia del aislamiento es rodeada por la del patógeno):

### 2.3.1 VARIEDADES SUSCEPTIBLES:

Variedad HA 300:

Ninguna de las cepas pertenecientes a *A. alternata*, *Penicillium sp* y levaduras resultó ser antagonista del patógeno. Por otro lado, el 33.33% de las cepas pertenecientes a *C. cladosporioides* mostraron antagonismo frente al patógeno. Mientras

que todas las cepas de *E. purpurascens* fueron antagonistas. El grado de reacción y otras observaciones se detallan en la tabla 2.8.

**Tabla 2.8:** detalle del comportamiento de las especies antagonistas aislados de la Variedad HA 300.

Especie fúngica	Aisl.	Pieza floral	Gr R	%ICR	Observaciones
<i>C. cladosporioides</i>	104	Corola(C1)	D2	33.33	-
	192	Estigma	D2	20	-
	181	Palea	D2	46.67	La base de la colonia de 181 se aclara al enfrentarse al patógeno
	42	Antera	D2	22.22	-
<i>E. purpurascens</i>	102	Estigma	D2	45.5	-
	193	Estigma	D3	25	-

#### Variedad Z 20028:

La única especie con 0% de cepas antagonistas resultó ser *C. cucumerinum*, que fue encontrado en muy baja frecuencia. Las mayores cantidades relativas de cepas antagonistas se presentaron en *F. sambucinum* (100%) y *Penicillium sp 2* (100%) que se encuentran en baja frecuencia (1.43%). *A. alternata* junto con *A. citri* poseen un 66.67% de antagonistas y frecuencia del 4.29%. *A. raphani* con una frecuencia del 2.86% tiene 50% de antagonistas.

La especie que tiene mayor frecuencia (21.43%), *C. cladosporioides* presenta junto con *C. cucumerinum*, los menores porcentajes de cepas antagonistas. Esto se detalla en la tabla 2.9.

De los aislamientos obtenidos resulta interesante el grado de antagonismo del aislamiento 131 (*A. citri*) que tiene grado de reacción (Gr R) D3, lo que está indicando que dicho aislamiento está produciendo algún inhibidor del crecimiento del patógeno. También se destaca el aislamiento 122 (*A. raphani*) causando un % ICR del 64.44%.

**Tabla 2.9.** detalle del comportamiento de las especies antagonistas aisladas de la Variedad Z 20028.

Especie fúngica	Aisl.	Pieza floral	Gr R	%ICR	Observaciones
<i>A. alternata</i>	133	Estigma	D2	31.11	-
	126	Palea	D2	30.89	-
<i>A. citri</i>	131	Antera	D3	42.22	Formación de halo de inhibición con d= 2mm
	128	Corola (C1)	D2	20	-
<i>A. raphani</i>	122	Palea	D2	64.44	-
<i>C. cladosporioides</i>	186	Palea	D2	25	-
<i>F. sambucinum</i>	79	Estigma	D2	20	Halo necrótico en 79 la zona de contacto con el patógeno
<i>Penicillium sp2</i>	134	Ovario	D2	26.67	

### 2.3.2 VARIEDADES TOLERANTES:

#### Variedad Z AV84-10:

Los mayores porcentajes de cepas antagonistas (100%) se presentan en *A. citri* cuya frecuencia es del 2.86%, *F. sambucinum*, *Penicillium sp 3*, *Penicillium sp 5* y *Penicillium sp 7* todos ellos con una frecuencia del 0.95%. Ver tabla 2.4. Luego son seguidos por *A. alternata* cuya f es del 4.76% cuyo porcentaje de antagonistas es del 80%. *C. cladosporioides* con 5.71% y tiene sólo el 50% de antagonistas y *F. graminearum* con 4.76% de frecuencia posee un 40% de antagonistas, entre ellos se encuentran cepas que demostraron crecimiento de hifas sobre el micelio del patógeno, es decir grado D2++. Esto se detalla en la tabla 2.10.



**Foto 2.1.** Cultivo dual del aislamiento 51 (*F. graminearum*) frente al patógeno. Grado de reacción: D2++. Vista superior.

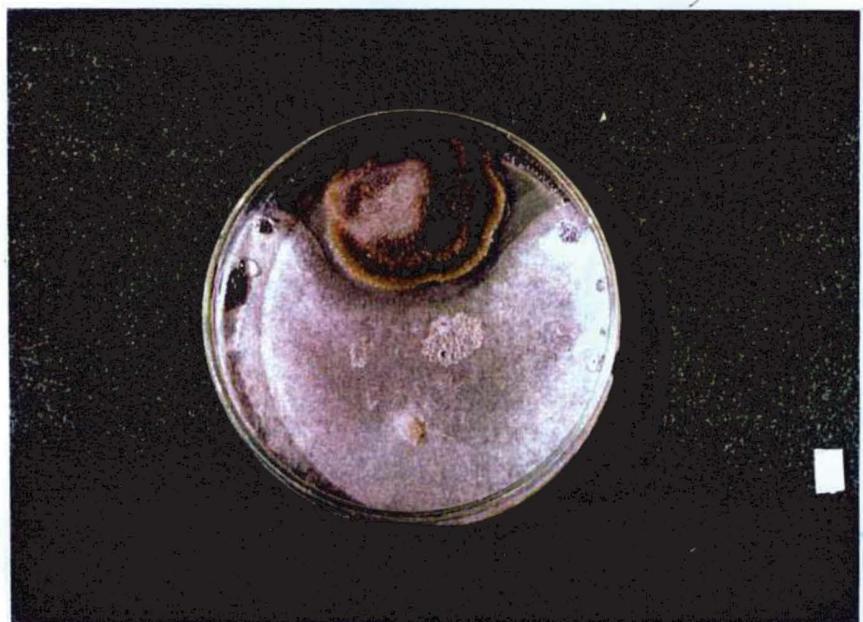


**Foto 2.2.** Cultivo dual del aislamiento 51 (*F. graminearum*) frente al patógeno. Grado de reacción: D2++. Vista inferior.

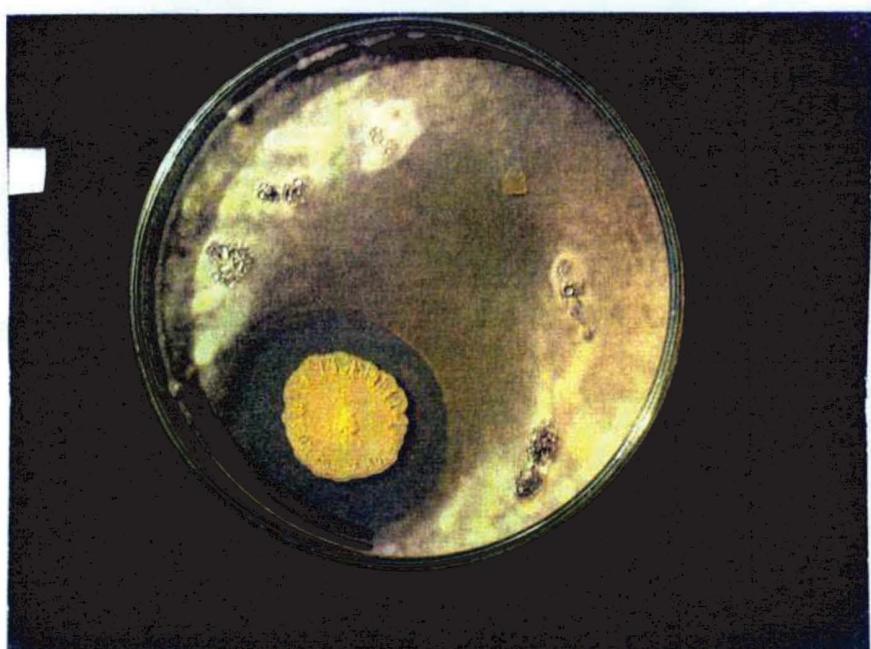
**Tabla 2.10:** detalle del comportamiento de las especies antagonistas aisladas de la Variedad Z AV84-10.

Especie fúngica	Aisl.	Pieza floral	Gr R	% ICR	Observaciones
<i>A. alternata</i>	87	Ovario	D2	42.22	-
	45	Antera	D2	51.11	-
	47	Estigma	D2	60	47 posee micelio más denso en presencia del patógeno
	58	Estigma	D2	57.78	El patógeno es menos denso a 1mm del borde de la colonia de 58.
<i>A. citri</i>	88	Corola (C1)	D2	48.89	El patógeno no llega a rodearlo totalmente.
	48	Estigma	D2	53.33	-
	97	Palea	D2	46.67	-
<i>C. cladosporioides</i>	91	Corola (C1)	D2	30.7	91 posee el borde de la colonia más oscuro en presencia del patógeno.
	92	Estima	D2	25.55	-
	95	Estigma	D2	46.67	-
<i>F. graminearum</i>	51	Antera	D2++	68.89	-
	54	Estigma	D2++	77.78	-
	53	Estigma	D5	28.89	Formación de halo de inhibición con d= 7mm
<i>F. sambucinum</i>	52	Antera	D2++	91.11	-
<i>Penicillium sp 3</i>	174	Papus	D2	22.22	-
<i>Penicillium sp 5</i>	176	Ovario	D2	55.56	-
<i>Penicillium sp 7</i>	96	Antera	D2	60	-

Entre los aislamientos obtenidos se destacan los aislamientos 51 (Fotos: 2.1 y 2.2) y 54 (ambos pertenecientes a la especie *F. graminearum*) y 52 (*F. sambucinum*) por presentar grado D2++, demostrando crecimiento sobre el patógeno, sin embargo sin llegar a cubrirlo totalmente. Estos aislamientos ocasionan un %ICR del 65.89%, 77.78% y 91.11% respectivamente. De modo que puede considerarselos como buenos antagonistas del patógeno. También se destacan el aislamiento 53 (*F. graminearum*) ya que determina la inhibición del crecimiento del patógeno dando origen a un halo de inhibición con d= 7mm, por lo tanto esta cepa produce un metabolito que actúa como antibiótico frente al patógeno. El aislamiento 188 (*A. citri*) si bien da un GrR de tipo D2 no llega a ser rodeado completamente por el patógeno (Foto 2.9).



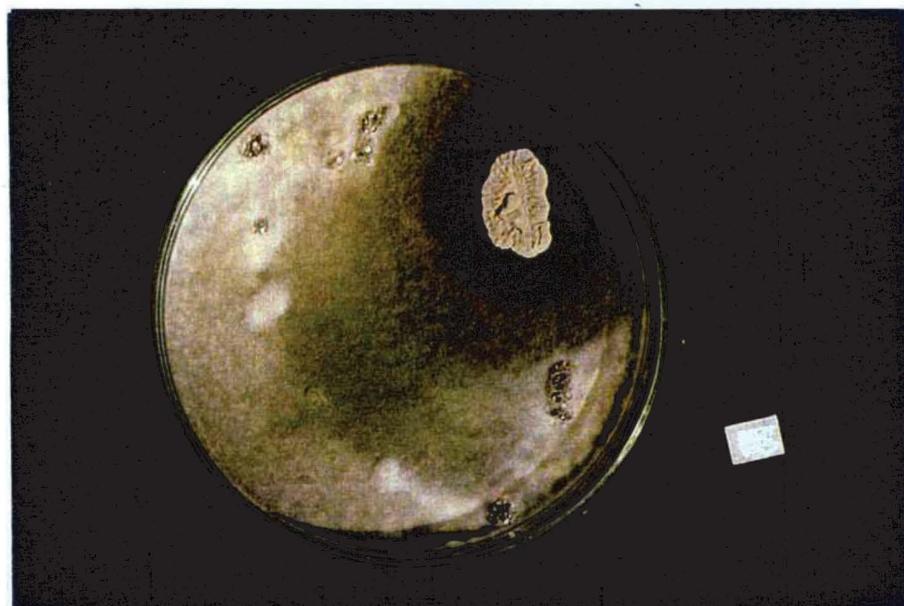
**Foto 2.3.** Cultivo dual del aislamiento 75 (*A. radicini*) frente al patógeno. Grado de reacción: D5.



**Foto 2.4.** Cultivo dual del aislamiento 188 (Levadura ACII) frente al patógeno. Grado de reacción: D5.



**Foto 2.5.** Cultivo dual del aislamiento 36 (Levadura AM) frente al patógeno. Grado de reacción: D5.



**Foto 2.6.** Cultivo dual del aislamiento 34 (Levadura M) frente al patógeno. Grado de reacción: D5. Notar el borde con necrosis en la colonia de *S. sclerotiorum*

### Variedad Z 20018:

Los mayores porcentajes de antagonistas (100%) los presentan las especies de *A. alternata* y *A. raphani*. Ninguna de las cepas de *C. cladosporioides* presenta antagonismo frente al patógeno. Respecto de *F. nivale* que es la especie con mayor frecuencia (8.57%), sólo el 33.33% de sus cepas resultaron antagonistas del patógeno (Tabla 2.5).

Entre las cepas obtenidas se destaca el aislamiento 64 (*A. alternata*) con GrR: D3 que origina un halo de inhibición con d= 1mm.

**Tabla 2.11:** detalle del comportamiento de las especies antagonistas aisladas de la Variedad Z 20018.

Especie fúngica	Aisl.	Pieza floral	Gr R	% ICR	Observaciones
<i>A. alternata</i>	64	Corola (C1)	D3	33.33	Formación de halo con d= 1mm
	172	Estigma	D2	61.10	-
<i>A raphani</i>	111	Corola (C1)	D2	38.89	-
<i>F. nivale</i>	60	Antera	D2	51.11	-
	61	Antera	D2	25	Hay una zona de 9 mm de espesor donde el patógeno es menos denso y a partir de donde hay formación de esclerocitos. Oscurecimiento en la periferia de la colonia de 61

### Variedad Z 30629:

Las especies con mayor porcentaje de antagonistas (100%) son *C. cladosporioides* con f: 4.76 %, *F. graminearum* con F: 3.81 %, *F. sambucinum* con F: 2.86% y *A. radicini*, *A. raphani*, Levadura ACII e indeterminada III, cuyas F son las menores encontradas: 0.95% (Tabla 2.6).

*A. alternata* que resultó ser la especie más frecuente, sólo presentó el 46.15% de cepas antagonistas. También se destacan *A. citri* con 85.71% de antagonistas y baja F (6.67 %), *A. clamydospora* y *E. purpurascens* ambos con 83.33% de antagonistas y F= 5.71 % (Tabla 2.6).

Entre las cepas se destacan (Tabla 2.12): 1) el aislamiento 166 (*A. citri*) con GrR D5, que ocasiona la inhibición del crecimiento del patógeno, dando origen a un

halo de inhibición con  $d= 3\text{mm}$  y %ICR= 43.33% y 2) el aislamiento 75 (*A. radicini*) también con GrR D5 y  $d=3\text{mm}$ ; en este caso el %ICR es del 41.11% (Foto 2.3).

**Tabla 2.12:** detalle del comportamiento de las especies antagonistas aisladas de la Variedad Z 30629.

Especie fungica	Aisl.	Pieza floral	Gr R	% ICR	Observaciones
<i>A. alternata</i>	68	Corola	D2	40	Escaso micelio aéreo del patógeno.
	121	Ovario	D2	48.89	-
	185	Ovario	D2	31.11	-
	65	Papus	D2	55.55	-
	158	Corola	D2	34.88	-
	164	Estigma	D2	55.56	-
<i>A. citri</i>	166	Estigma	D5	43.33	Halo de inhibición con $d= 3\text{ mm}$ , crecimiento de micelio del patógeno a través del agar con incipiente necrosis del mismo.
	70b	Antera	D3-D2	46.67	Halo de inhibición con $d=2\text{ mm}$ ; pero luego llegan a ponerse en contacto.
	119	Corola	D2	50	-
	78	Estigma	D2	35.56	-
	142	Antera	D2	37.78	Oscurecimiento del medio de cultivo en la zona de contacto entre los micelios.
	156	Corola	D2	44.44	El patógeno no forma sus esclerocitos cerca de 156, sino sobre todo en los bordes de la caja.
<i>A. clamydospora</i>	72	Antera	D2	48.89	El patógeno da abundante micelio aéreo; pero es menor en la zona de contacto.
	118	Corola	D3	33.33	Halo con $d= 2\text{mm}$ , con lupa puede observarse algo de necrosis en el micelio del patógeno.
	152	Ovario	D2	33.33	El patógeno crece menos en una banda de 2 mm de espesor alrededor del borde de la colonia de 152.
	168	Ovario	D2	40	-
	169	Ovario	D2	46.67	-
<i>A. radicini</i>	75	Estigma	D5	41.11	Halo de inhibición con $d= 3\text{ mm}$
<i>A. raphani</i>	160	Antera	D2	20	-

<i>C. cladosporioides</i>	191	Ovario	D2	26.67	Durante 4 días se mantuvo un halo de inhibición con d= 1mm.
	201	Nectario	D2	40	201 posee la base de la colonia más clara en la zona de enfrentamiento.
	200b	Papus	D2	57.78	-
	190	Ovario	D2	28.89	-
	189	Palea	D2	20	-
<i>E. purpurascens</i>	116	Palea	D2	46.67	-
	157	Corola	D2	65.25	-
	154	Papus	D2	33.33	Necrosis del micelio del patógeno en la zona de contacto entre las colonias.
	167	Nectario	D2	33.33	-
	162	Antera	D2	67.78	El patógeno da escaso micelio aéreo.
<i>F. graminearum</i>	151	Estigma	D2	20	-
	141	Antera	D2++	85	141 colorea el medio marrón oscuro al crecer sobre el patógeno.
	170	Estigma	D2++	53.33	-
<i>F. sambucinum</i>	145	Antera	D2	25.56	-
	147	Antera	D2	43	-
<i>Indeterm. III</i>	74	Estigma	D2	15.56	El patógeno no llega a rodear completamente a 74.
<i>Levadura ACII</i>	188	Palea	D5	25.56	Oscurecimiento del micelio del patógeno alrededor del halo de inhibición con d= 5 mm.

#### Variedad HA 302:

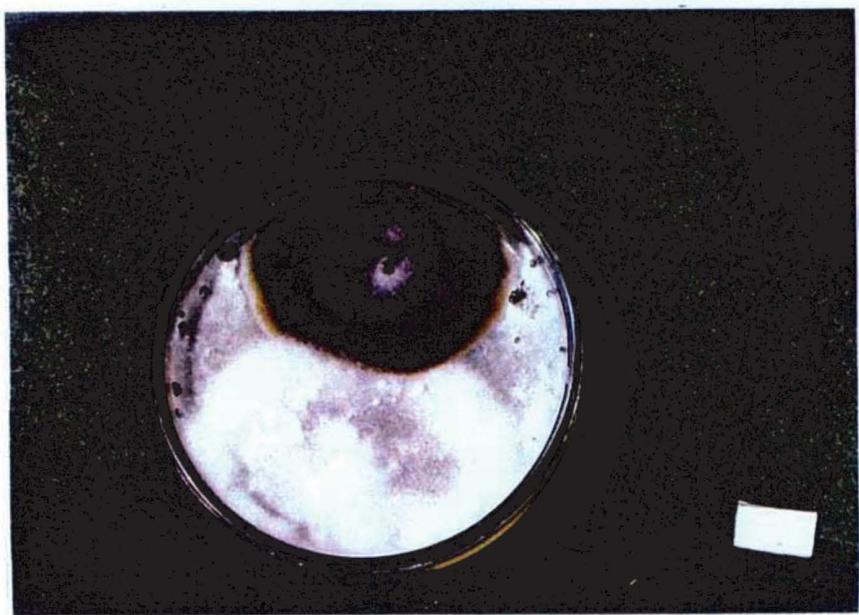
Como puede observarse en la tabla 2.7 sólo indeterminada II y *A. cheiranti*, que se encuentran en baja frecuencia, tienen 0% de antagonistas, las restantes especies tienen porcentajes de antagonistas superiores al 60%.

*C. cladosporioides*, la especie de mayor frecuencia posee un 60% de antagonistas; *A. alternata*, la especie que le sigue en frecuencia ( $F=6.67\%$ ), tiene un 85.71% de antagonistas y *A. citri* ( $F= 4.76 \%$ ) tiene 60% de antagonistas.

Las restantes especies tienen bajas frecuencias; pero alcanzan un 100% de antagonistas.



**Foto 2.7.** Cultivo dual del aislamiento 116 (*E. purpurascens*) frente al patógeno. Grado de reacción: D2.



**Foto 2.8.** Cultivo dual del aislamiento 65 (*A. alternata*) frente al patógeno. Grado de reacción: D2.

**Tabla 2.13:** detalle del comportamiento de las especies antagonistas aisladas de la Variedad HA 302

Especie fúngica	Aisl.	Pieza floral	Gr R	% ICR	Observaciones
<i>A. alternata</i>	13	Palea	D2	44.4	El micelio del patógeno es menos denso alrededor de la colonia de 13.
	16	Palea	D2	40	Menor crecimiento de micelio del patógeno alrededor de 16, con necrosis del mismo.
	21	Palea	D2	40	-
	2(2)	Antera	D2	37.78	Abundante desarrollo de micelio aéreo de ambas colonias.
	2(3)	Antera	D2	55.56	-
	2(7)	Estigma	D2	31.11	-
<i>A. citri</i>	26	Estigma	D5	46.67	Halo de inhibición con d= 2.5 mm.
	19	Palea	D2	22.85	-
	3a	Palea	D2	36.67	-
<i>A. clamydospora</i>	20	Palea	D2	33.33	-
Especie fúngica	Aisl.	Pieza floral	Gr R	% ICR	Observaciones
<i>A. raphani</i>	30	Estigma	D2	51.11	-
<i>C. cladosporioides</i>	12	Estigma	D2	35.56	La base de la colonia de 12 se aclara frente al patógeno.
	35	Corola (C2)	D2	31.11	Oscurecimiento de la colonia de 35 en la zona de contacto.
	37	Estigma	D2	25.56	Micelio del patógeno más laxo en zona de contacto.
	11	Corola	D2	17.78	Algo de micelio del patógeno llegó a crecer sobre 11, pero no prosperó.
	5	Estigma	D2	33.33	-
	2(5)	Estigma	D2	33.33	Abundante micelio aéreo del patógeno, pero lejos de 2(5).
<i>D. indica</i>	14g	Palea	D2	82.22	-
<i>F. graminearum</i>	2(1)	Antera	D2++	85	Depósito rosado (pigmento?) sobre los restos del micelio del patógeno y bordeando el frente de avance y necrosis en la zona de contacto.
<i>Indeterm. I</i>	10	Corola	D1	22.22	-
<i>Levadura AC</i>	38	Corola	D5	30.56	Halo de inhibición con d=7 mm.
<i>Levadura AM</i>	36	Estigma	D5	45.13	Halo de inhibición de 10 mm.

<i>Levadura M</i>	34	Corola	D5	33.33	Halo de inhibición de 12 mm, importante necrosis en el micelio del patógeno. 34 al igual que en la caja testigo oscurece el medio de cultivo.
<i>Penicillium sp8</i>	2M	Antera	D2	51.11	El micelio de 2M se aclara en contacto con el patógeno.

Entre las cepas obtenidas se destacan (Tabla 2.13):

a) con GrR de tipo D5: aislamiento 26 (*A. citri*), que ocasiona un %ICR del 46.67% y un halo de inhibición con  $d=2.5$  mm; aislamiento 38 (levadura AC) cuyo halo de inhibición posee un  $d= 7$  mm (Foto 2.4); aislamiento 36 (levadura AM) con halo de inhibición con  $d= 10$  mm (Foto 2.5); aislamiento 34 (levadura M) que origina un halo de inhibición con  $d= 12$  mm y un % ICR del 33.33%. Es muy interesante notar que este aislamiento originaría un metabolito, quizás el involucrado en la inhibición del crecimiento del patógeno, que oscurece el madio de cultivo y es producido aún cuando el patógeno no está presente (testigo), además causa una importanbe necrosis en el micelio del patógeno (Foto 2.6).

b) con GrR de tipo D2++ el aislamiento 2(1), que origina un %ICR del 85%. Éste, además de crecer sobre el patógeno produce un pigmento rosado que bordea el frente de avance, depositándose sobre el micelio del patógeno y que tal vez esté involucrado en la necrosis del mismo en la zona de contacto.

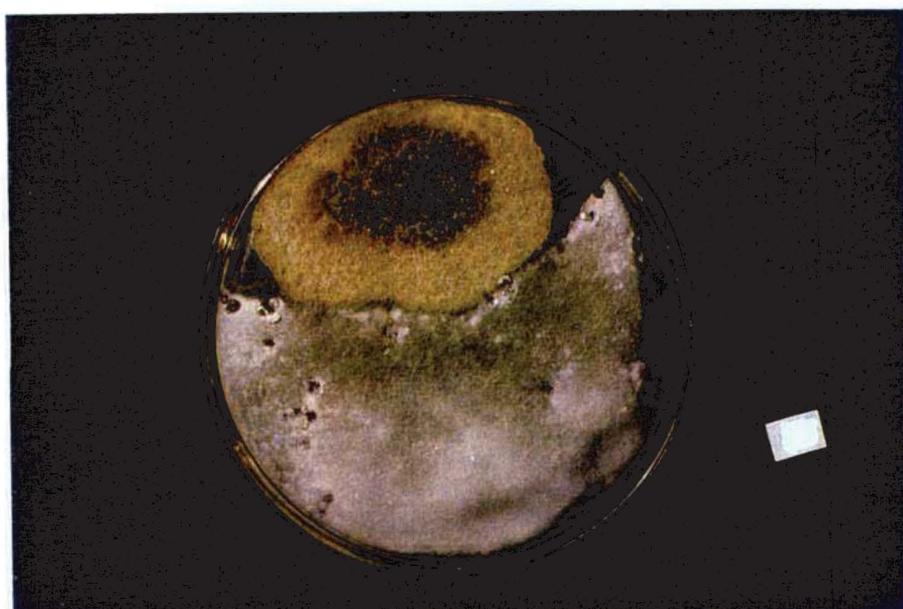


Foto 2.9. Cultivo dual del aislamiento 3(a) (*A. citri*) frente al patógeno. Grado de reacción: D2.

En el caso de las VT, las variedades Z AV 84-10 y Z 20018, tienen un 50% de especies antagonistas siendo este valor superior al hallado en las VS (HA 300: 35.29% y Z 20028: 28%), mientras que las VT Z 30629 y HA 302 poseen valores significativamente mayores, siendo del 76.19% y 75.76%, respectivamente.

De acuerdo con los resultados obtenidos puede observarse que muchas especies tales como *A. citri* (26) y (166), *A. radicini* (75) y *F. graminearum* (53) y especies de levaduras, como: Lev. AC (38), Lev. AM (36), Lev. M (34), Lev. ACII (188), que presentan un grado de reacción de tipo D5, dan origen a halos de inhibición con  $d > 2$  mm, lo que estaría indicando la liberación al medio de metabolitos secundarios que actúan inhibiendo el crecimiento del patógeno. Si bien estas cepas fueron aisladas a partir de variedades tolerantes, lo que explicaría en parte su comportamiento, las mismas se encuentran en frecuencias muy bajas con respecto a las restantes.

Otras cepas tienen grado de tipo D3, es decir que causan la inhibición del crecimiento del patógeno, dando origen a halos de inhibición con  $d \leq 2$  mm, entre ellos se encuentran *E. purpurascens*(193), *A. alternata* (64), *A. citri*(70b) y (131), *A. clamydospora*(118), en éste caso sólo los aislamientos (193) y (131) pertenecen a variedades susceptibles.

Por otra parte, cepas pertenecientes a las especies *F. graminearum* y *F. sambucinum* han demostrado cierta capacidad de crecimiento a expensas del patógeno, lo que indicaría algún grado de micoparasitismo. Entre ellos se encuentran los siguientes aislamientos: *F. graminearum* (51), (54), (170), (141), (2(1)); *F. sambucinum* (52). Todos ellos también fueron obtenidos a partir de variedades tolerantes.

Los cepas restantes presentan grado de reacción de tipo D2, lo que indicaría que son capaces de impedir el crecimiento del patógeno; pero sin liberación de metabolitos y sin llegar a crecer sobre él. Tal es el caso por ejemplo de los aislamientos 116 (*E. purpurascens*), (Foto 2.7) y el aislamiento 65 (*A. alternata*) (Foto 2.8).

#### 2.4 AISLAMIENTO DE ENDOFITOS A PARTIR DE OVARIO:

El resultado de la siembra de ovarios en agar-malta luego de la esterilización

superficial dejó como saldo un total de 18 cepas de hongos, todas ellas con una frecuencia del 20%.

En la variedad HA 300 se obtuvieron 3 aislamientos: una cepa perteneciente a la especie *Circinella linderi*, una a la especie *Aspergillus niger* y por último una perteneciente al género *Penicillium* (*Penicillium sp a*).

A partir de la variedad HA302 se obtuvieron 2 cepas , una perteneciente a *Aspergillus niger* y la restante al género *Penicillium* (*Penicillium sp b*).

De la variedad Z 30629 se obtuvieron: una cepa de la especie *C. linderi* y una especie de levadura y por último, a partir de la variedad Z AV 84-10 se obtuvo una cepa perteneciente a la especie *C. linderi*.

Además se logró aislar otras 10 cepas pertenecientes a cepas de levaduras, pero que no se logró recuperar luego de colocadas en heladera.

**Tabla 2.14:** grado de reacción (GrR) y %ICR presentados por los aislamientos obtenidos mediante esterilización superficial.

Especie fúngica	Aislamiento	Variedad	Grado de reacción	%ICR
A. niger	VII	HA 302 (T)	D2	60
	VIII	HA 300 (S)	D2	55
C. linderi	II	HA 300 (S)	D2	50
	II	Z 30629 (T)	-	-
	III	z AV 84-10 (T)	D2	60
Levadura DI	VI	Z 30629 (T)	D2	28.89
Penicillium sp a	IV	HA 302 (T)	-	-
Penicillium sp b	V	HA 300 (S)	-	-

Como puede observarse en la tabla 2.14, salvo los aislamientos II, IV y V, todos los demás demuestran GrR de tipo D2 y los mayores %ICR se obtuvieron de la variedad HA 302 y Z AV 84-10, ambas variedades tolerantes.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

Consideramos que la respuesta que presenta *H. annuus* frente al auge de *S. sclerotiorum* en capítulo, es la resultante de una serie de factores que en mayor o menor medida tendrán influencia en el comportamiento diferencial que presentan las variedades estudiadas ante el patógeno.

La resistencia a la enfermedad que incluye resistencia a la penetración y resistencia al desarrollo y dispersión de la enfermedad (Kamamura y Ono, 1948).

La primera de ellas incluye cualquier estructura que impide la entrada del patógeno, no se presenta en ninguna de las piezas florales de las variedades estudiadas. En este caso incluimos a corola, antera y pistilo (estigma y estilo) de las dos variedades que son las que reciben el inóculo en el método empleado. El papus y el ovario por su cercanía al receptáculo, se cree que no son alcanzados por las ascosporas y su invasión se daría por el pasaje desde las otras piezas. Estos resultados coinciden con los encontrados por Lamarque et al (1985). El ovario sólo es alcanzado en una de las muestras de las VS y en VT ni siquiera hay desarrollo en las porciones basales de las otras piezas.

Sin embargo la penetración de cada una de las partes de la flor es diferente, tal es el caso de la corola que es colonizada en t2 en VS y recién en t3 en VT. Esto podría estar indicando que existiría una mayor resistencia a la penetración en la VT que no se presenta en la VS; pero que de todos modos no impide la penetración sino que la retrasa.

El estudio de los factores relacionados con este aspecto, tales como espesor de cutícula, presencia de pelos, ceras o bien algún componente de la pared de las células epidérmicas, etc, requiere del empleo de la microscopía electrónica de barrido (MEB) y de técnicas microquímicas. Por lo tanto la metodología empleada en este trabajo no permite evaluar si la cuticula y los pelos, dificultan la germinación de las ascosporas, tal como lo observaron Lamarque et al (1985) en la corola de las variedades FORSOL y BOLERÓ.

Lo que se ha observado en ambas variedades es la importante correlación existente entre el crecimiento de micelio y la presencia de granos de polen. Abawi & Grogan (1975) y Gulya et al (1997) establecieron que el desarrollo del patógeno requiere no sólo de agua sino también de una fuente de energía exógena. Además en la época de

floración el polen permite el desarrollo de las hifas infectivas a partir de las ascosporas (Says-Lesage & Tourvieille, 1988).

La marcada relación del crecimiento del patógeno con los granos de polen se ha encontrado en las dos variedades, establecer si en el caso de la VS éste favorece el desarrollo deberá ser evaluado más exhaustivamente. Los estudios realizados por Bazzalo (com. personal) han demostrado que "in vitro" el polen proveniente de diferentes variedades de girasol, incluyendo HA 302 y HA 89 que son las estudiadas en este trabajo, promovió el desarrollo de micelio. Sin embargo no observó diferencias significativas entre los efectos promotores del polen de las variedades estudiadas.

Por lo tanto podemos decir que en los dos primeros tiempos (24 hs y 6 días) y sobre todo en el primero la presencia de los granos de polen o, bien algún compuesto depositado en su pared, entre las espinulas de la superficie que favorece el desarrollo del patógeno. Con posterioridad hay un denso desarrollo en superficie y finalmente se produce la penetración de los tejidos.

Lamarque et al (1985) encontraron que en los estambres se producía un alto porcentaje de germinación de ascosporas sin penetración en las variedades FORSOL y BOLERÓ, en nuestros estudios ,sin embargo las anteras constituyeron las piezas con mayor ataque. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Says-Lesage y Tourvielle (1988) quienes observaron en el híbrido experimental CR2, altos índices de germinación y mayor penetración en la superficie de los estambres en relación con las demás piezas. En este caso trabajaron con alta humedad relativa, que es como se mantuvieron las plantas en el campo en nuestro ensayo.

En las variedades HA 302 y HA 89 estudiadas, tanto pistilo como corola fueron penetrados aunque en diferente grado, en cambio en el híbrido CR2 Says-Lesage & Tourvielle (1988) no encontraron este fenómeno, sólo la presencia de polen permitió la penetración.

En anteras, la existencia de terpenos en los tricomas glandulares como fue observado en variedades "silvestres" de girasol se han asociado con la resistencia a insectos (Gershenson et al, 1985) y estos compuestos tendrían también propiedades antifúngicas. Esta hipótesis queda descartada en las dos variedades en estudio. Las anteras y precisamente la porción apical de las mismas, donde se encuentran estos

tricomas están densamente colonizadas por el patógeno, lo que descarta esta hipótesis y por lo tanto la evaluación de los compuestos presentes en estos tricomas.

La resistencia al desarrollo y dispersión de la enfermedad, creemos que es la principal causa en la respuesta diferencial entre las variedades. Por lo tanto puede decirse que habría un mecanismo de tipo posinfeccional o inducido (Horsfall & Dimond, 1959).

Las observaciones realizadas en el estilo en las dos variedades y de corola de la VT, muestran colapso de los tejidos y coloración de los mismos con safranina (color rojo) a diferencia de las flores testigo donde no sólo no hay colapso sino que su coloración es celeste (fast green) lo que es de esperar debido a que se trata de células vivas con pared primaria. De manera que se producen cambios en la respuesta de los tejidos frente a la tinción convencional en presencia del hongo. Éste altera los tejidos en forma local y lo que se observa es que éstos toman con safranina, sobretodo sus paredes, pero también en algunos casos su contenido. Esta coloración en flores atacadas podría constituir una barrera de tipo física postinfeccional que involucra la síntesis y deposición de nuevo material o de otros carbohidratos en la pared celular que impiden el desarrollo del patógeno. Bazzalo (1986) encontró cambios en las paredes de las células de los tallos, que incluían la esterificación de ácidos fenólicas que dificultarían o impedirían el paso del patógeno. Muchas investigaciones han descripto alteraciones de las paredes celulares relacionadas con la resistencia a enfermedades tales como deposición de polímeros de fenoles oxidados, lignificación impregnación de las paredes con ácidos fenólicos, etc. Para determinar tales cambios será necesario realizar estudios microquímicos (por ejemplo test de taninos) y analíticos.

El colapso celular se observa en corola y estilo de VT y en menor grado y podría considerarse una reacción de defensa metabólica inducida por el patógeno, ya que no se observa en flores testigo de la misma edad. Entre los síntomas observados en el campo en la VT se encontró la necrosis de las corolas. Esta observaciones están correlacionadas con las realizadas microscópicamente en la misma variedad.

La respuesta es más evidente cuanto más tiempo transcurre desde la inoculación. En los primeros tiempos en la VT se insinúa y, si bien no hay penetración en la corola puede observarse que hay achatamiento en las células epidérmicas de la misma acompañada por una la ligera coloración rojiza en presencia de micelio en la superficie,

además como se ha observado en *Brassica sp* (Jamaux et al, 1995) las papilas en presencia de esporas del patógeno se notan colapsadas. Sin embargo esta respuesta es parcial, no tan generalizada en el caso de las variedades de girasol del presente trabajo y no se observó en las variedades FORSOL y BOLERÓ y el híbrido experimental CR2 (Says-Lesage & Tourvielle, 1988; Lamarque et al, 1985) A diferencia de esto, en la VS no se observa nunca esta reacción en los primeros tiempos. En t2 donde ya hay penetración en la corola, con cierto colapso y oscurecimiento en los tejidos; pero dentro de la coloración celeste-azulado.

En el caso del colapso del estílo en presencia de micelio, en la VT está presente en los primeros dos tiempos, en t1 en una de las flores muestreadas y en t2 en todas. Sin embargo en t3 puede observarse que las hifas penetran y pueden crecer, según creemos intercelularmente. Este desarrollo se presenta hasta el tercio superior, a partir de allí el colapso es muy importante y detendría su avance. Este colapso se observa hasta la mitad de la pieza mientras que debajo de esta zona ya no hay colapso ni micelio.

El estílo y la corola, presentan las mayores diferencias en el t3, no sólo en cuanto al avance del patógeno sino también en relación con la respuesta de los tejidos que causarían las diferencias en el ataque.

En el caso de la VS el colapso en estílo también se presenta siendo mayor en la mitad superior del mismo; abarcando menor proporción de tejidos. Es mayor en la zona central. En la parte inferior es menor presentándose sobre todo en la zona central, y está claro que hay abundante desarrollo de hifas infectivas en su interior.

Por lo tanto, en el estílo, la respuesta se presenta en las dos variedades, siendo más efectiva en la VT, ya sea por ser más rápida o por ser más generalizada. De este modo y a través del estílo se produce la colonización del ovario. Esta infección no se observa en todas las flores de las VS; por no haber tenido el tiempo suficiente ya que el micelio se desarrolla libremente en la porción basal de esta pieza. Del mismo modo en las flores muestreadas en t3 de la VS, hay un notable avance del patógeno en la porción basal de la corola. Por lo tanto el ovario podrá alcanzarse también a través de ella.

De acuerdo con lo observado en corola y siempre en t3, la respuesta de colapso celular, sólo se presenta en la VT y además se correlaciona con la necrosis observada en esta pieza floral en el campo al realizar la cosecha.

Esta respuesta en VT es muy evidente e involucraría la deshidratación de las células que es más marcada en ciertas zonas y que se visualiza como un oscurecimiento de los tejidos. Sin embargo la reacción no es generalizada, ya que en algunos grupos de células es menor y permite el desarrollo escaso de hifas, que se caracterizan por poseer menor diámetro que en las observadas dentro de la corola en la VS. Se colorean muchas veces de rojo (safranina). En la VS siempre se colorean de celeste (fast-green).

En las zonas con menor grado de colapso puede notarse que las células, algo deshidratadas, poseen algo de contenido que también se colorea de rojo, lo que indicaría la producción de algún compuesto antifúngico.

En el caso de la VS en corola hay poco colapso y del mismo modo que en flores testigo las células se colorean de celeste. Al no producirse tal respuesta, el desarrollo del micelio es muy profuso, el patógeno crece libremente, colonizando rápido y degradando fundamentalmente el tejido parenquimático. Además en esta variedad, se ha observado cristales en corola; pero también en estilo y en antera que no están presentes en las flores testigo. Es muy probable que constituidos por oxalato de calcio dado que se encuentran en las proximidades del patógeno y son de tipo drusas y serían producto de la precipitación del ácido oxálico que sintetiza el patógeno al combinarse con calcio. En este caso su presencia puede resultar la consecuencia de la degradación de las pectinas con la liberación de calcio. Lumsden(1979) ha descripto que el ácido oxálico tiene un efecto sinérgico sobre la actividad pectinolítica, a través de su acción quelante de calcio.

Por otro lado dado que el desarrollo en t3 de la VS es muy importante en la porción inferior de los filamentos, dentro de los tejidos del estilo y del ovario; la presencia de nectarios en la base del estilo, podría favorecer el desarrollo en la VS. Constituyendo otro factor que contribuye al comportamiento diferencial.

El análisis de las frecuencias de las diferentes especies fúngicas, permite establecer que hay diferencias en los pobladores de la “antósfera” de variedades tolerantes y susceptibles. Ciertas especies tales como *A. cheiranti*, *A. clamydospora*, *A. radicini*, *C. sphaerospermum*, *D. indica*, *F. graminearum*, *F. nivale*, *P. glomerata*, varias especies de levaduras y 3 especies pertenecientes a micelios indeterminados no se han encontrado en VS y en VT muchas de ellas se encuentran en baja frecuencia. Se

caracterizan por presentar fuerte antagonismo, tales como aislamientos pertenecientes a las especies *F. graminearum*, *A. clamydospora* y varias especies de levaduras.

En el estudio del antagonismo se encontró que los aislamiento de estas especies con baja frecuencia presentan grados de reacción D2++, D3 y D5.

En relación con los dos estudios realizados en las VT y VS, se determina que ambos factores: población fúngica antagonista y respuesta metabólica inducida por el patógeno, constituyen dos aspectos entre los múltiples relacionados con el comportamiento diferencial de las variedades. Por otro lado dado el comportamiento antagonista de los diferentes aislamientos obtenidos, se cree que el mismo influye determinando una colonización menor o por lo menos más lenta en VT, favoreciendo este retraso. Esto permite alcanzar la madurez de los aquenios y de este modo no habría colonización de los mismos al estar maduros (Lamarque et al, 1985).

Cosson et al (1993) encontraron en especies salvajes de girasol la producción de compuestos que parecen ser fitoalexinas y que se detectaron en áreas necróticas de estas especies. Además Bazzalo et al (1985), en el ataque en tallo encontraron que la presencia de compuestos fenólicos solubles aumentan en plantas de girasol inoculadas con el patógeno y que estarían involucrados con la resistenciaUn estudio exhaustivo, mediante el empleo de técnicas microquímicas y utilizando material no fijado, dado que muchos compuestos suelen diluirse al fijarse en FAA y en los suscesivos pasos que involucra la infiltración y desparafinado del material (Bazzalo, 1986).

Dado que al t3 (12 días) el micelio llega al ovario en la VS; pero no en la VT; otra etapa en la evaluación será determinar, mediante el muestreo en dos tiempos posteriores a t3, si el ovario llega a ser colonizado es decir, si el crecimiento del patógeno es detenido en VT o si hay algún tipo de respuesta en el mismo.

#### Control biológico:

Se formula la propuesta de emplear las cepas aisladas para el control biológico de la enfermedad aumentando la frecuencia de estos microrganismos en el momento de máxima susceptibilidad (antesis y días posteriores).

Sin embargo, coincidiendo con Morris & Dickinson (1981) el estudio del comportamiento antagonista “*in vitro*”, en agar, sólo constituye un prueba preliminar para la evaluación y será necesario realizarla tanto sobre la planta hospedante y en el campo. las diferencias físicas entre cultivos “*in vitro*” y en condiciones naturales son considerables. De hecho el crecimiento “*in vivo*” es mucho menos profuso y por lo tanto el antagonismo menos marcado. Si los organismos producen metabolitos solubles su acción también podría ser diferente (Faifer & Bertoni, 1988). Si bien el estudio en invernáculo puede brindar parte de la información de la interacción en el hospedante, un microorganismo puede instalarse en forma adecuada en condiciones de invernáculo; pero no en el campo (Pieckenstain et al, 1998). la cepa empleada por estos investigadores no constituía un poblador natural del girasol.

La selección realizada en este trabajo es un estudio preliminar, sin embargo los organismos obtenidos probablemente estén mejor adaptados y puedan colonizar mejor las inflorescencias a campo.

También es posible el empleo de una mezcla de cepas antagonistas; para evaluar su acción frente al patógeno, ya que podrían actuar sinérgicamente. Escande et al (1998) quienes emplearon diferentes aislamientos de *Trichoderma spp.* determinaron que una mezcla de tales aislamientos brindó una protección más efectiva frente al patógeno.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abawi, G.S. & R.G. Grogan. 1975. Source primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. Phytopathology 65: 300-309.

Abawi, G.S., F.J. Polach & W.T. Molin. 1975. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. Phytopathology 65:673-678.

Adams P.B. & W.A. Ayers. 1979. Ecology of Sclerotinia species. Symposium of *Sclerotinia*. Phytopathol. 69: 896-899.

Agrios G.N. 1988. Plant Pathology 3° ed. Academic Press, Inc. EE. UU. San Diego, California. pp:803.

Akai, S & M. Fukutomi. 1980. Preformed Internal Physical Defense. En: Plant Disease: An Advanced Treatise. Vol. V. Cap. 8. pp: 139-159. Eds: J.G. Horsfall & E.B. Cowling. Academic Press, New York.

Akai, S. 1959. Histology of Defense in Plants. Cap. 11:391-434. En: Plant Pathology. Ed: J.G. Horsfall & A.E. Dimond. Vol. I. The Diseased Plant. Academic press. New York And London. pp: 674.

Alabouvette C. & J. Louvet. 1973. *Sclerotinia sclerotiorum*. Bibliographie selectionnée (Dec. 1971). Inform. Tech. Centre Tech. Interprof. and Oleag. Metrop. 31: 7-26.

Andreoli Y., C. Navarro & F. Laich. 1990. Control biológico de enfermedades criptogámicas por bacterias del grupo *Pseudomonas* fluorescentes a) *Sclerotinia sclerotiorum* en girasol. Avances y resultados 1988/1989. Informe preparado para la reunión anual 1990.

Auger, J.S. & 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). Agric. Técnica 30 (3): 161-165.

Baker, J.F. 1990. Sunflower trichomes defenses avoided by a sunflower stem weevil *Cylindrocopturus adspersus* LeConte (Coleoptera: Curculionidae). J. Kans. Entomol. Soc. 63: 638-341.

Barkai-Golan,R. 1974. Production of cellulase and polygalacturanase by *Sclerotinia minor*. Mycopathol. Mycol. Appl. 54: 297-302.

Bateman, D.F. & S.V. Beer. 1965. Simultaneous Production and Synergistic Action of Oxalic acid and Polygalacturanase during Pathogenesis by *Sclerotinia rolfsii*. Phytopath. 55: 204-211.

Bazzalo M.E. 1982 (a): Relación entre la edad de inoculación de *Helianthus annuus* crecido bajo condiciones controladas, y su susceptibilidad frente a *Sclerotinia sclerotiorum*. Proc. 2nd Congr. Latinoam. de Fitopatol. Bs As., Argentina.

Bazzalo M.E. 1982 (b). Estudios preliminares para la identificación de sustancias inhibidoras en *Helianthus annuus* del crecimiento in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum*. Proc. 2nd Congr. Latinoam. de Fitopatol. Buenos Aires, Argentina.

Bazzalo M.E., E.M. Heber, M.A. Del Pero Martinez & O.H. Caso. 1985. Phenolic compounds in stems of sunflower plants inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and their inhibitory effects on the fungus. Phytopathology 2, 112: 322-332.

Bazzalo, M.E. 1986. Mecanismos de defensa en *H. annuus* L. frente al ataque del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Centro de Ecofisiología vegetal (CONICET-FECIC-FUND. M. LILLO). Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas.

Beckman, C.H. 1980. Defenses triggered by the Invades Physical Defenses. En: Plant Disease: An Advanced Treatise Cap. 12. pp:225-245. Eds: J.G. Horsfall & E.B. Cowlings. Academic Press, New York.

Bell, A.A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32. 21-81.

Blakeman J. P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: Biological control on the Phylloplane. pp: 6-30) Ed: Windels C.E. & S.E. Lindow. The American Phytopathological Society St Paul, Minnesota. pp: 169.

Blakeman J.P. & A. Sztejnberg. 1973. Effect of surface wax on inhibition of germination of *Botrytis cinerea* spores on beet root leaves. Physiological Plant Pathology 3: 269-78.

Booth C. 1977. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. pp: 58.

Boyle, C. 1921. Studies in the phisiology of parasitism.VI. Infection by *Sclerotinia libertiana*. Ann. Bot. 35:337-347.

Brown, W. 1936. The Physiology of host parasite relations. Botan.0 Rev. 2: 236-281.

Byrde, R.J.W. & C.V. Cutting. 1973. Fungal patogenicity and the plant's response. Proc. 3° Long Ashton Symp., Univ. Bristol. 1971. Academic Press, London and New York.

Carmichael, J.W., W. Bryce Kendrick, I.L. Conners & Lynne Sigler. 1980. Genera of Hyphomycetes pp: 386.

Calonge, F.D., A.H. Fielding, R.J.W. Bytde & O.A. Akinreon. 1969. Changes in ultrastructure following fungal invasion and the possible relevance of extracellular enzymes. J. Exp. Bot. 20 (63): 350-357.

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.

Chet Y. & R. Baker. 1981. Isolation and Biocontrol Potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathol. 71: 286-290.

Chet Y. 1987. *Trichoderma*- Application, Mode of Action, and Potential as a Biocontrol Agent of soilborne Plant Pathogenic Fungi. En: Innovative Approaches to Plant Disease Control. Ed: Y. Chet, J. Wiley & Sons, New York pp: 137-160.

Colotelo, N. 1974. A scanning electron microscope study of developing sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Bot. 52: 1127-1130.

Cook, R.J. & K.F. Baker 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. 539pp.

Cosson L., H. Serieys, D. Tourvieille & C. Andary. 1993. Resistance factors of cultivated and wild sunflowers to *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Mechanisms of Plant Defense Responses, 385. Eds: B. Fritting & M. Legrand. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Cruickshank, J.A.M. 1963. Phytoalexins. Ann. Rev. Phytopathol. 1: 351-374.

Cuk, L. 1978. White rot in sunflowers form of stem disease. 8th International Sunflower Conference Minneapolis, U.S.A.: 279-281.

D' Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas de histología vegetal. Editorial Hemisferio Sur S. A. Bs As. Argentina pp: 83.

De Bary A. 1886. Ueber einige *Sclerotinien* und Sclerotienkrankheiten. Bot.Z. 44: 377-474.

De Bary, A. 1887. Comparative morphology and biology of the Fungi, Mycetozoa and Bacteria. Clarendon Press. Oxford, England.: 380-382.

Dueck, J. & S.J. Campbell. 1978. Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in sunflower. Proc. 8th Int. Sunflower Conf. Minneapolis, Minnesota, USA: 305-310.

Echandi, E. & J.C. Walker. 1957. Pectolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathol. 47: 303-306.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceus Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England. pp:608.

Ellis, M.D. 1976. More Dematiaceus Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England. pp: 507.

Escande A.; F. Laich; G. Cuenca; O. Bailez & V. Pereyra. 1994. Dispersión de inóculo de *Trichoderma spp.* mediante abejas (*Apis mellifera*) para el control de la pudrición del capítulo del girasol (*Sclerotinia sclerotiorum*). En: Resúmenes del VII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Pontificia Universidad Católica de Chile. Resumen N° P58.

Escande, A.R; M.V. Pedraza & M.E. Agüero. 1998. Evaluación de *Gliocladium spp.* y *Trichoderma spp.* para el biocontrol de la pudrición húmeda del capítulo de girasol (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib. de Bary). En : Acta de Resúmenes del Primer Congreso Argentino de Control biológico de enfermedades de las plantas. Buenos Aires. Argentina. Resumen N° 6.

Faifer G. C. & M. D. Bertoni. 1988. Interactions between epiphytes and endophytes from the phyllosphere of *Eucalyptus viminalis*- III. Nova Hedwigia 47: 1-2. (219-229).

Fernández Valiela, M.V. 1978. Introducción a la fitopatología, Vol. III: Hongos. Colección Científica del Inta. Bs. As. República Argentina. pp: 779.

Friend, J. 1977. Phenolic substances and plant disease. En: Recent advances in Phytochemistry. Vol. 12: Biochemistry of plants phenolics, 557-588. Eds: Swain, T.; Harborne, J. & Van Sumere Ch. Plenum Press, New York and London.

Gäumann, E. 1950. Principles of Plant Infection. (English ed. by W.B. Brerley), Crosby Lockwood, London.

Gershenson J.; M. Rossiter M.; C.E. Rogers M. Blust & T.L. Hopkins. 1985. Insect antifeedant terpenoids in wilt sunflower, a possible source of resistance to the sunflower moth in bioregulators for pest control. American Chemical Society, chap. 30: 433-4.

Grogan R.G. & Abawi G.S. 1975. Influence of water potential on growth and survival of *Whetzelinia scerotiorum*. Phytopathology 65: 122-128.

Gulya t, K.Y. Rashid and S.M. Maserevic. 1997. Sunflower Disease Cap. 6 pp: 263-379 En Sunflower Technology and Production. Ed.: Scheneiter A.A. American Society of Agronomy, Crop Sciense of America and Science Society of America Publishers. Madison, Wisconsin.

Gulya, T.J. 1989. *Sclerotinia*. Head rot of sunflower in North Dakota. Incidence, Effect on Yield and Oil Components and Sources of resistance. Plant Disease 73 (6): 504-507.

Hancock J.G. 1972 (a). Hemicellulose degradation in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotirum*. Plant Physiol. 49: 358-367.

Hancock J.G. 1972 (b). Changes in cell membrne pemeability in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant. Physiol. 49: 358-364.

- Heiser. 1969. En: Vranceanu 1977 El Girasol. Ed.: Mundi-Prensa. Madrid.
- Holtzhausen, M.A. & G.C.A. Van der Westhuizen. 1980. *Sclerotinia* wilt and head rot in sunflower South Africa Republic, Div. Agric. Information, F.2.
- Horsfall, J.G. & A.E. Dimond. 1959. Plant pathology. An advanced treatise. Vol. I. The diseased plant. Academic Press, New York and London. 674pp.
- Huang H.C. & G.C. Kozub. 1991. Monocropping to sunflower and decline of decline wilt. Bot. Bull. Academia Sinica 32:163-170.
- Huang, H. C. & J. A. Hoes. 1980. Importance of plant spacing and sclerotial position to development of *Sclerotinia* wilt of sunflower. Plant. Dis. 64: 81-84.
- Huang, H. C. & J. Dueck. 1980. Wilt of sunflower from infection by mycelial-germinating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Plant Pathol. 2: 47-52.
- Hughes, S.J. 1951. Studies on Micro-fungi. VII. Allescheriella Crocea, Oidium Smile, and Pellicularia Pruittana. Mycological Papers, N° 41 pp: 17.
- Jamaux Y., B. Gelie & C. Lamarque. 1995. Early stages of infection of rapessed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. Plant Pathology 44: 22-33.
- Jones, D. 1970. Ultrastructure and composition of the cell walls of *Sclerotinia sclerotiorum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 54: 351-360.
- Jones, D. 1976. Infection of plant tissue by *Sclerotinia sclerotiorum*: a scanning electron microscope study. Micron 7: 275-279.

- Kamamura, E. & K.Ono. 1948. Studies on the resistance of foreign rice plants to blast disease. Bull. Natl. Agr. Expt. Sta. Japan 4: 13-22.
- Khare, K.B. & G. Bompeix. 1976. Activies proteolytiques des *Sclerotinia sclerotiorum* et *Sclerotinia minor*: role possible lors de la pathogenese. Rev. Mycol. (Paris) 40: 65-84.
- Kohn L.M. 1979(a). Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. Symposium on *Sclerotinia (=Whetzelinia)*: taxonomy, biology and pathology. Phytopathol. 69: 873-886.
- Kohn, L. M. 1979(b). A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. Mycotaxon. Vol.IX (2): 365-444.
- Köller W. 1991. The plant cuticle: a barrier to the overcome by fungal plant pathogens. In: Cole G.T., H.C. Hoch, eds. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. New York, U.S.A.: Plenum Press: 219-246.
- Kosasih, B. D. & H. J. Willets. 1975. Ontogenetic and histochemical studies of the apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*. Ann. Bot. 39: 185-191.
- Kosuge, T. 1969. The role of phenolics in host response to infection. Ann. Rev. Phytopath. 7: 195-222.
- Kranz J. 1981. Hyperparasitism of biotrophic fungi. (327-352). In: Microbial Ecology of the Phyloplane. J.P. Blakemand. Academic Press, London. pp:502.
- Kuc J. 1964. Phenolic compounds and disease resistance in plants. En: Phenolics in Normal and Diseased Fruits and vegetables: 63-81. Ed.: Runeckles. Imperial Tobacco Co., Montreal.

Kuc J. 1976. Phytoalexins. In: Heitefuss, R. & P.H. Williams (eds.). Encyclopedia of Plant Physiol., New series: vol. 4: Physiological Plant Pathology, 632-646. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York.

Lamarque C. 1976. Elements de Biologie du *Sclerotinia sclerotiorum* sur tournesol à *S. sclerotiorum*. Ann. Amélior. Plantes (Paris) 23: 279-286.

Lamarque C. 1984. Organisation de l'inflorescence (=capitule) d' *Helianthus annuus*. C.E.T.I.O.M. Informations Technique.

Lamarque C.; M. Leconte; J. Berrier & A.M. Jaunet. 1985. Recherche des sites de contaminations du capitule de tournesol par les ascospores de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. C.E.T.I.O.M. Informations Techniques 92: 27-35.

Le Clercq, P. 1973. Influence de facteurs hereditaires sur la résistance apparente du tournesol à *Sclerotinia sclerotiorum*. Ann. Amélior. Plantes (paris) 23: 279-286.

Le Tourneau D. 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. Symposium on *Sclerotinia* (=Whetzelinia): taxonomy, biology and pathology. Phytopathology. 69(8): 887-890.

Lumsden, R.D. 1970. Phosphatidase of *Sclerotinia sclerotiorum* produce in culture and in infected bean. Phytopathology 60: 1106-1110.

Lumsden R. D. 1979. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. Symposium on *Sclerotinia* (=Whetzelinia): taxonomy, biology and pathology. Phytopathol. 69(8):890-896.

Lumsden R.D. 1992. Mycoparasitism of soilborne plant pathogens. En: Mycology Series; vol. 9: The Fungal Community. Its organization and role in the ecosystem. Second edition. De: George C. Carroll y Donald T. Wicklow. 931pp.

Lumsden, R. D & R.L. Dow 1973. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection in bean. *Phytopathology* 63: 708-715.

Martinez F., S. Prioletta & M.E. Bazzalo. 1992. Evaluación del grado de agresividad de distintas cepas de *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal de las podredumbres del capítulo y del tallo del girasol (*Helianthus annuus*). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 28(1-4):

Maxwell, D.P. & R.D. Lumsden. 1970. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. *Phytopathology* 60: 1395-1398.

Melander, L.W. & J.H. Craigie. 1927. Nature of resistance of *Berberis spp.* to *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 17:95-114.

Mesterházy A. & A. Gulyas. 1988. New Methods of Testing Resistance of sunflower to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Proc. 12th Int. Sunflower Conf. II: 73-78. Novi Sad, Yugoslavia.

Morris P. Y. & D. J. Dickinson. 1981. Laboratory studies on the antagonist properties of *Scytalidium spp.* to Basidiomycetes with regard to biological control. 12<sup>th</sup> Annual Meeting, Sarajevo, Yugoslavia. 11-15 May 1981 pp: 16.

Nelson, P.E., T.A. Toussoun & W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University press. University Park and London. pp: 193

Newton H.C. 1972. *Sclerotinia sclerotiorum* incitant of lettuce drop: sources of inoculum, host resistance and mechanism of pathogenesis. Ph. D. thesis, Microfilm 72-4, 292, Univ. Microfilms, Inc. Ann. Arbor, MI 135pp.

Orellana, R.G. 1975. Photoperiod influence on the susceptibility of sunflower to *Sclerotinia* stalk rot. *Phytopathology* 65: 1293-1298.

Overeem, J.C. 1976. Preexisting antimicrobial substances in plants and their role in disease resistance. En: Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships. Eds. J. Friend & D R. Threlfall. Academic Press. New York.

Overell B.T. 1952. A toxin in culture filtrates of *Sclerotinia sclerotiorum*. Austr. J. Sci. 14: 197-198.

Parkinson, D. & S.T. Williams. 1961. A method for isolating fungi from soil microhabitats. Plant and Soil 13: 347-355.

Peres A., Y. Regnault & L.M. Allard. 1989. *Sclerotinia sclerotiorum*. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle sur bourgeon terminal du tournesol. C.E.T.I.O.M. Informations Techniques 107:3-5.

Peres, A.; Y. Regnault & J.G. Pierre. 1986. Recherche d'une méthode de lutte contre *Sclerotinia sclerotiorum* de capitule de tournesol. CETIOM. Informations Techniques 97.

Pereyra V. R. & M. E. Bazzalo. 1991. Comportamiento del girasol frente a la podredumbre del capítulo provocada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*. Material de Divulgación N° 19, agosto. E.E.A. Balcarce. INTA.

Pereyra, V. R. & Bazzalo, M.E. 1988. Podredumbre del capítulo del girasol. Jornada de actualización técnica para profesionales. Balcarce.

Pereyra, V.R.; M.E. Bazzalo & C. Sala. 1991. Variabilidad y estabilidad entre híbridos comerciales de girasol para la resistencia a la podredumbre del capítulo causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. 1º Reunión Nacional de Oleaginosos. Rosario. Argentina.

Pieckenstain, F; M. Bazzalo; A. Roberts & R. Ugalde. 1998. *Epicoccum purpurascens* como agente de control biológica de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. En : Acta de Resúmenes del Primer Congreso Argentino de Control biológico de enfermedades de las plantas. Buenos Aires. Argentina. Resumen N°. 23

Prior, G.D. & J.H. Owen. 1964. Pathological anatomy of *Sclerotinia trifoliorum* on clover and alfalfa. *Phytopathology* 54: 784-787.

Purdy, L.H. 1958. Some factors affecting penetration and infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 48: 605-609.

Purdy L. H. 1979. History, disease and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. Symposium on *Sclerotinia*: taxonomy, biology and pathology. *Phytopathology* 69 (8):875-880.

Raper, K.B. & D.I. Fennell. 1965. The Genus *Aspergillus*. The Williams y Wilkins Company. Baltimore. pp: 686.

Saito, I. 1973. Initiation and development of apothecial stipe primordia in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 14: 343-351.

Saito, I. 1974. Ultrastructural aspects of the maturation of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Trns. Mycol. Soc. Jpn.* 15: 384-400.

Sarville, E.G. 1936. The nature of resistance of flax to *Melampsora lini*. *J. Agr. Research* 53: 81-127.

Says-Lesage V. & D. Tourvieille. 1988. Recherche des sites de pollution et d'infection des fleurons de tournesol, in situ, par les spores de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Informations Techniques. C.E.T.I.O.M.* 102: 3-13.

Scönbeck, F. & E. Schlösser. 1976. Preformed substances as potentials protectans. En: Encyclopedia of Plant Physiol.; New Series. Vol. 4. Physiological Plant Pathol. 655-678. Eds: R. Heitefuss & P H. Williams. Springer-Verlag, Berlin.

Sedun, F. S. & J.F. Brown. 1987. Infection of sunflower leaves by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. Annals of Applied Biology Biology 110: 275-285.

Seiler, G.J. 1997. Anatomy and morphology of Sunflower. Cap.: 3: 67-111. En: Sunflower Technology and Production. Ed.: Scheneiter A.A. American Society of Agronomy, Crop Sciense of America and Science Society of America Publishers. Madison, Wisconsin.

Smedegaard-Peterson V. 1985. The limiting effect of disease resistance on yield. Ann. Rev. Phytopathol. 23: 475-490.

Spring , O & U. Bienert. 1987. Capitate glandular hairs from sunflower leaves: Development, distribution, and sesquiterpene lactone content. J. Plant Physiol. 103: 441-448.

Steadman, J.R. 1979. Control of Plant Diseases Caused by *Sclerotinia* species. Symposium on *Sclerotinia*: taxonomy, biology and pathology. Phytopathology 69 (904-907).

Steadman, J.R. & K.W. Nickerson. 1975. Differential inhibition of sclerotial germination in *Whetzelinia sclerotiorum*. Mycopathologia 57: 165-170.

Sutton B.C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. pp:696.

Tariq V.N. & Jeffries. 1984. Apressorium formation by *Sclerotinia sclerotiorum*: Scanning Electron Microscopy. Trans. Brit. Mycol. Soc. 82(4): 645-651.

Thault, M.C. & D.Tourvieille. 1988. Etudes du Pouvoir pathogene de huit isolats de *Sclerotinia* appartenant aux espèces *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* et *S. trifoliorum* sur tournesol. Inf. Tech. CETIOM. 103 II: 21-27.

Thomson S.V.; M.N. Schroth; W.J. Moller & W.O. Reil. 1976. Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flower by *Erwinia amylovora*. Phytopathology 66: 1457-1459.

Tochiani, Y. 1951. The functional resistance in plants. Shokubtsu Byōgai Knyu kyoto 4: 1-17.

Tourvieille, D. & F. Vear. 1986. *Sclerotinia*: lutte par l'amélioration génétique, la résistance. La défense des végétaux 238: 16-21.

Tourvielle D., Vear F. & Achbani E.H. 1992. Attack of sunflower terminal buds by *Sclerotinia sclerotiorum*, symptoms and resistance. 13th International Sunflower Conference, Pisa, Italy: 859-864.

Whetzel, H. H. 1945. A synopsis of the genera and species of the Sclerotiniaceae, a family of stromatic inoperculate discomycetes. Mycología 37: 648-714.

Williams, G. H. & J. H. Western. 1965. The biology of *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. and other species of sclerotium-forming fungi II. The survival of sclerotia in soil. Ann. Appl. Biol. 56: 261-268.

Yoshii, Ha. 1936. Pathological studies on rice blast caused by *Piricularia oryzae* II. On the mode of infection of the pathogen. Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 6: 205-218.

Zimmer D.E. & J.A. Hoes. 1978. Diseases. En: Sunflower Science and Technology 225-262. Ed: J.F. Carter. ASA, CSSA, SSSA. Wisconsin.

Zycha H. & R. Siepmann. 1969. Mucorales. Eine beschreibung aller gattungen und arten dieser pilzgruppe. D-3301 Lehre Verlag Von J. Cramer. pp: 355.



  
Michael Rodger

  
Nadia Venedik