

Tesis de Posgrado

Control biológico de enfermedades causadas por Sclerotinia Sclerotiorum en el girasol y estudio del rol de las poliaminas en las distintas etapas del ciclo de vida de este patógeno

Pieckenstain, Fernando Luis

2002

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

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

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

Cita tipo APA:

Pieckenstain, Fernando Luis. (2002). Control biológico de enfermedades causadas por Sclerotinia Sclerotiorum en el girasol y estudio del rol de las poliaminas en las distintas etapas del ciclo de vida de este patógeno. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3526_Pieckenstain.pdf

Cita tipo Chicago:

Pieckenstain, Fernando Luis. "Control biológico de enfermedades causadas por Sclerotinia Sclerotiorum en el girasol y estudio del rol de las poliaminas en las distintas etapas del ciclo de vida de este patógeno". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3526_Pieckenstain.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



TESIS
CS. BIOLÓGICAS
3526
Pieckenstain
Fernando Luis

Biblioteca FCEyN * UBA

03526

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Instituto de Investigaciones Biotecnológicas
Instituto Tecnológico de Chascomús
IIB – INTECH**

**Control biológico de enfermedades causadas por
Sclerotinia sclerotiorum en el girasol y estudio del rol de las
poliaminas en las distintas etapas del
ciclo de vida de este patógeno.**

Tesista: Fernando L. Pieckenstain

Director: Dr Rodolfo A. Ugalde

**Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

2002

No 3526

Agradecimientos

Al Dr. Rodolfo Ugalde, por su invaluable y productiva labor como director de tesis, la cual contribuyó significativamente a mi formación. También me ha transmitido su pasión por la investigación científica y me ha brindado su amistad.

Al Dr Oscar Ruiz, por su valioso desempeño como director asistente y por brindarme su amistad y apoyo incondicional desde el día de mi llegada a Chascomús. Por su carácter afable y su capacidad de transmitir fuerza para enfrentar las situaciones adversas. Desde los primeros años de vida del INTECH, su labor constante ha contribuido enormemente al progreso de nuestro Instituto.

Al Dr Luis E. Díaz (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA), por su apoyo en la realización de tareas científicas y por su amistad sincera.

Al CONICET y a la Fundación COREPRO, por el apoyo económico brindado.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, y en especial a muchos de sus docentes, por haber desempeñado un papel clave en mi formación de grado y post-grado.

Al Ing. Alberto León de la empresa Advanta Seeds (Balcarce), por abrirme las puertas de dicha empresa para llevar a cabo varios de los ensayos realizados en este trabajo.

A la Dra. María Eugenia Bazzalo, de la misma empresa, por transmitirme muchos de sus valiosos conocimientos de fitopatología y por brindarme todo su apoyo para el diseño y la realización de gran parte de los ensayos de control biológico.

Al estadístico Adrian Roberts (ex miembro de Advanta Seeds, actualmente miembro de 'Biomathematics and Statistics Scotland', Edimburgo, Escocia), por su invaluable colaboración en el análisis estadístico de los resultados de los capítulos I y II.

A los Señores Fabián Bianchini (Advanta Seeds, Balcarce) y José Luis Burgos (IIB-INTECh) por su valiosa asistencia técnica en los ensayos de control biológico

Al Biot.. Diego Bustos, por su colaboración en el procesamiento del material fotográfico.

A todos los compañeros del IIB-NTECH, investigadores, becarios y personal de apoyo, todos los cuales han contribuido de alguna manera a la realización de este trabajo y además han hecho que nuestro instituto se transforme en un excelente lugar de trabajo.

A los Dres. Antonio Fernández Tiburcio y Teresa Altabella (Universidad de Barcelona, España), por el amplio apoyo brindado a todo nuestro grupo de investigación, por su amistad y su hospitalidad.

A Diego y a Victoria, por su amistad desde su temprano arribo al INTECh.

A toda la gente que se incorporó en tiempos más recientes a la Unidad de Biotecnología 1 y contribuye con su trabajo y su buena voluntad a que sigamos adelante.

A todos aquellos del IIB-INTECh que se han vuelto buenos amigos míos, especialmente aquellos con los que he compartido agradables veladas.

A mis padres, abuelos, mi hermano Fede, mi suegra y mis amigos, por su apoyo incondicional.

A Julia y Lucía, por su amor y por darme ganas para seguir siempre adelante y acompañarme en todo.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron dados a conocer en distintas publicaciones y reuniones científicas

Presentaciones a congresos nacionales

Pieckenstain FL & RA Ugalde (1994). Evaluación de *Epicoccum nigrum* como controlador de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. *Taller sobre aportes de la fitopatología a la producción agropecuaria, Asociación Argentina de Fitopatología, Buenos Aires.*

Pieckenstain FL; LA Díaz & RA Ugalde (1995). Purificación de un inhibidor del crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* producido por *Epicoccum nigrum*. *XXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología Molecular, Villa Giardino, Córdoba.*

Pieckenstain FL; ME Bazzalo, AMI Roberts & RA Ugalde (1998). *Epicoccum purpurascens* as a biological control agent of sunflower head rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *I Congreso Argentino de Control Biológico de Enfermedades de las Plantas. Buenos Aires.*

Pieckenstain FL; D Sánchez, A D'Antuono & OA Ruiz (1999). Rol de las poliaminas en el crecimiento y la diferenciación del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. *XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Mendoza.*

Garriz A, C Dalmasso, M Marina, A Khomutov, OA Ruiz & FL Pieckenstain. Polyamine metabolism during germination of *Sclerotinia sclerotiorum* ascospores. *XXXVII Reunión Anual de Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Villa Carlos Paz, Cba. BIOCELL (2001) Vol 25, supp II, pag 25.*

Presentaciones a congresos internacionales

Pieckenstain FL & OA Ruiz (1999). Efecto de un inhibidor de la síntesis de poliaminas sobre el crecimiento y la diferenciación del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. *III Congreso Latinoamericano de Micología, Caracas, Venezuela.*

Pieckenstain FL, A Garriz, E Chornomaz, D Sánchez & OA Ruiz (2000). Inhibition of polyamine biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Polyamines 2000, II European Polyamine Conference, Rimini, Italia.*

Garriz A, FL Pieckenstain, C Dalmasso & OA Ruiz (2001). Polyamine metabolism during vegetative growth and ascospore germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Gordon Research Conference on Polyamines, New Haven, Connecticut, USA*.

Pieckenstain F, A Garriz, C Dalmasso, M Marina, E Rivas & OA Ruiz (2002). El metabolismo de poliaminas en el crecimiento y la diferenciación de hongos fitopatógenos. *IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa, Veracruz, México*.

Publicaciones

Pieckenstain FL; ME Bazzalo, AMI Roberts & R Ugalde (2001). *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. *Mycological Research* **105**: 77-84.

Pieckenstain FL, A Gárriz, E Chornomaz, DH Sánchez & OA Ruiz (2001). The effect of polyamine biosynthesis inhibition on growth and differentiation of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal for General Microbiology and Molecular Biology* **80**: 245-253.

Abreviaturas

ACB: agente de control biológico
ADC: arginina descarboxilasa
ADN: ácido desoxirribonucleico
AdoMet: S-adenosilmetionina
AdoMet DC: AdoMet descarboxilasa
APG: agar papa glucosado
ARN: ácido ribonucleico
ASG: agar semilla girasol
Cad: cadaverina
CHA: ciclohexilamina
CPELG: caldo papa extracto levadura glucosado
DAO: diamino oxidasa
DAP: 1,3-diaminopropano
DFMA: α -difluorometilarginina
DFMO: α -difluorometilornitina
ELISA: del inglés 'enzyme-linked immunosorbent assay'
EDTA: ácido etilen diamina tetra-acético
FRCA: fracción rica en compuestos antifúngicos
HCl: ácido clorhídrico
HPLC: del inglés 'high pressure liquid chromatography'
KOH: hidróxido de potasio
MGBG: metilglioxal bis[guanil hidrazona]
ODC: ornitina descarboxilasa
PAO: poliamino oxidasa
PCA: ácido perclórico
p.i.: post-inoculación
PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro
Put: putrescina
Spd: espermidina
Spm: espermina
Spd sint: espermidina sintasa
Spm sint: espermina sintasa

Indice	página
Introducción general	
I.1.- <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	
I.1.1.- Ubicación taxonómica y ciclo de vida.	1
I.1.2.- Hospedantes y distribución geográfica.	3
I.2.- El girasol: generalidades, ubicación taxonómica e importancia económica.	3
I.3.- Interacción <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> - girasol.	
I.3.1.- Podredumbre basal.	4
I.3.1.1.- Importancia.	4
I.3.1.2.- Sintomatología.	4
I.3.1.3.- Tolerancia genética.	5
I.3.2.- Podredumbre del capítulo.	5
I.3.2.1.- Importancia.	5
I.3.2.2.- Sintomatología.	6
I.3.2.3.- Tolerancia genética.	6
I.4.- Métodos tradicionales de lucha contra las enfermedades del girasol producidas por <i>S. sclerotiorum</i>	7
 Objetivos generales	 8
 Capítulo I.- Interacción <i>Epicoccum purpurascens</i>-<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>in vitro</i> y el potencial del primero como agente de control biológico de la podredumbre de capítulos de girasol.	
 Resumen	 9
 Introducción	
I.1.- Control biológico de enfermedades de las plantas.	
I.1.1.- Generalidades.	11
I.1.2.- Mecanismos de acción de agentes de control biológico.	12
I.1.2.1.- Parasitismo.	12
I.1.2.2.- Competencia por nutrientes.	13
I.1.2.3.- Antibiosis.	14
I.1.2.4.- Protección cruzada.	15
I.1.3.- Estrategias de control biológico.	16
I.1.3.1.- Estrategias de control biológico de enfermedades provocadas por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	17
I.1.3.1.1- Reducción de la cantidad de inóculo inicial.	17
I.1.3.1.2.- Reducción de la diseminación secundaria de inóculo	18

I.1.3.1.3.- Bloqueo de la infección en la rizosfera.	19
I.1.3.1.4.- Bloqueo de la infección en el filoplano.	19
I.1.3.1.5.- Reducción de la virulencia.	20
I.2.- <i>Epicoccum purpurascens</i> .	
I.2.1.- Ubicación taxonómica, distribución geográfica y características ecológicas.	21
I.2.2.- <i>E. purpurascens</i> como agente de control biológico de enfermedades de plantas.	22
Objetivos	24
Materiales y métodos	
MM.1.- Aislamiento de <i>S. sclerotiorum</i> .	25
MM.2.- Cultivo <i>in vitro</i> de <i>S. sclerotiorum</i> .	25
MM.2.1.- Obtención de esclerocios.	25
MM.2.2.- Obtención de ascosporas.	25
MM.2.3.- Germinación de ascosporas.	26
MM.3.- Aislamiento de cepas de <i>E. purpurascens</i> .	26
MM.4.- Cultivo <i>in vitro</i> de <i>E. purpurascens</i> .	27
MM.4.1- Determinación de las condiciones de cultivo óptimas para la esporulación.	27
MM.4.2- Obtención de conidios.	28
MM.5.- Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i> .	28
MM.5.1.- Interacción de colonias en placas de Petri.	28
MM.5.2.- Interacción de tubos germinativos derivados de esporas.	29
MM.6.- Cultivo de plantas de girasol.	30
MM.6.1.- Material vegetal.	30
MM.6.2.- Ensayos en invernadero.	30
MM.6.3.- Ensayos a campo.	30
MM.7.- Determinación del potencial de <i>E. purpurascens</i> para el control de la podredumbre de capítulos de girasol causada por <i>S. sclerotiorum</i>	30
MM.7.1.- Ensayos en invernadero.	30
MM.7.1.1.- Experimento 1.	30
MM.7.1.2.- Experimento 2.	32
MM.7.2.- Ensayos a campo.	33
Resultados	
R.1.- Antagonismo entre <i>E. purpurascens</i> y <i>S. sclerotiorum</i> <i>in vitro</i> .	34
R.1.1.- Obtención de conidios de <i>E. purpurascens</i> .	34
R.1.2.- Interacción de colonias en placas de Petri.	35
R.1.2.1.- Observación macroscópica.	35

R.1.2.2.- Observación microscópica.	37
R.1.3.- Germinación de esporas e interacción entre tubos germinativos.	39
R.2.- <i>E. purpurascens</i> como agente de control biológico de la podredumbre de capítulos de girasol causada por <i>S. sclerotiorum</i> .	41
R.2.1.- Ensayos en invernadero.	41
R.2.1.1.- Experimento 1.	41
R.2.1.2.- Experimento 2.	45
R.2.1.3.- Efecto de la aplicación de conidios de <i>E. purpurascens</i> y la infección por ascosporas de <i>S. sclerotiorum</i> sobre la productividad de plantas de girasol.	47
R.2.2.- Ensayos a campo.	49
Discusión	50
Conclusiones	54
Capítulo II.- Propiedades de los compuestos antifúngicos producidos por <i>Epicoccum purpurascens</i> y el potencial de su aplicación para prevenir enfermedades del girasol causadas por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	
Resumen	56
Introducción	58
Objetivos	60
Materiales y métodos	
MM.1. Obtención de una fracción rica en compuestos antifúngicos (FRCA) producidos por <i>E. purpurascens</i> .	61
MM.2.- Determinación del efecto de la FRCA sobre el crecimiento de micelio y la germinación de ascosporas de <i>S. sclerotiorum in vitro</i> .	61
MM.3.- Determinación del efecto de la FRCA sobre la germinación de conidios de otros hongos patógenos del girasol.	62
MM.4.- Determinación del efecto de la FRCA sobre la germinación de conidios de <i>E. purpurascens</i> .	63
MM.5.- Determinación del efecto del pH sobre la retención de los compuestos antifúngicos en columnas de fase reversa.	63
MM.6.- Determinación del efecto del pH sobre la actividad biológica de la FRCA.	63

MM.7.- Determinación del efecto de la aplicación de la FRCA sobre el desarrollo de podredumbre de hojas.	64
MM.8.- Determinación del potencial de la FRCA para el control de la podredumbre de capítulos de girasol causada por <i>S. sclerotiorum</i> .	65
MM.9.- Determinación del efecto del pH sobre la estabilidad de la FRCA.	65

Resultados

R.1.- Propiedades de los compuestos antifúngicos producidos por <i>E. purpurascens</i> .	66
R.1.1.- Efecto de los compuestos antifúngicos sobre el crecimiento de patógenos de girasol <i>in vitro</i> .	66
R.1.1.1.- Crecimiento de micelio de <i>S. sclerotiorum</i> .	66
R.1.1.2.- Germinación de ascosporas de <i>S. sclerotiorum</i> y conidios de otros hongos patógenos.	67
R.1.2.- Efecto sobre la germinación de conidios de <i>E. purpurascens in vitro</i> .	68
R.1.3.- Efecto del pH sobre la retención de los compuestos antifúngicos en columnas de fase reversa.	71
R.1.4.- Efecto del pH sobre la actividad biológica de la FRCA.	72
R.1.5.- Efecto del pH sobre la estabilidad de la FRCA.	73
R.2.- La FRCA como tratamiento preventivo de enfermedades del girasol causadas por <i>S. sclerotiorum</i> .	74
R.2.1.- Efecto de la aplicación de la FRCA sobre el desarrollo de podredumbre de capítulos.	74
R.2.2.- Efecto de la aplicación de la FRCA sobre el desarrollo de podredumbre de hojas.	76

Discusión

D.1.- Generalidades.	77
D.2.- El potencial de los compuestos antifúngicos producidos por <i>E. purpurascens</i> como tratamiento preventivo de algunas enfermedades del girasol causadas por <i>S. sclerotiorum</i> .	78
D.3.- El rol de los compuestos antifúngicos en la interacción entre <i>E. purpurascens</i> y <i>S. sclerotiorum</i> .	79
D.4.- El espectro y el modo de acción de los compuestos antifúngicos.	81

Conclusiones	82
---------------------	-----------

Capítulo III.- El metabolismo de poliaminas en *Sclerotinia sclerotiorum* y su relación con procesos de crecimiento y diferenciación.

Resumen	84
Introducción	
I.1.- Metabolismo de poliaminas.	87
I.1.1.- Generalidades.	87
I.1.2.- Biosíntesis de poliaminas.	89
I.1.3.- Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas.	89
I.1.3.1- Inhibidores de la ODC.	91
I.1.3.2- Inhibidores de la ADC.	91
I.1.3.3.- Inhibidores de la AdoMetDC.	92
I.1.3.4.- Inhibidores de la Spd Sint.	92
I.1.4.- Catabolismo de poliaminas.	93
I.2.- El rol de las poliaminas en procesos de crecimiento, diferenciación y patogénesis en hongos.	94
I.2.1.- El rol de las poliaminas en la transición dimórfica.	94
I.2.2.- El rol de las poliaminas en otros procesos de diferenciación.	95
I.2.3.- El rol de las poliaminas en la patogénesis.	96
I.3.- El potencial de inhibidores de la síntesis de poliaminas como fungicidas.	97
Objetivos	99
Materiales y métodos	
MM.1.- Determinación del efecto de los inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre el crecimiento de micelio y el desarrollo de esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> .	100
MM.2.- Determinación del efecto de los inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre la germinación de ascosporas y el crecimiento de micelio derivado de las mismas.	100
MM.3.- Determinación del efecto los de inhibidores sobre los niveles de poliaminas libres en micelio.	101
MM.4.- Determinación de actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas.	102
MM.5.- Incorporación de precursores de la biosíntesis de poliaminas por el micelio de <i>S. sclerotiorum</i> .	104
MM.6.- Determinación del efecto de la DFMO sobre la incorporación de ornitina por el micelio de <i>S. sclerotiorum</i> .	105
MM.7.- Determinación del efecto de los inhibidores sobre la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas.	105

Resultados	
R.1.- Efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre procesos de crecimiento y diferenciación que ocurren durante el ciclo de vida de <i>S. sclerotiorum</i> .	105
R.1.1.- Efecto de inhibidores sobre el crecimiento de micelio.	105
R.1.2.- Efecto de inhibidores sobre el desarrollo de esclerocios.	106
R.1.3.- Efecto de inhibidores sobre la germinación de ascosporas y el crecimiento de micelio derivado de las mismas.	109
R.1.4.- Efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre los niveles de las mismas en micelio.	110
R.2.- Biosíntesis de poliaminas en micelio de <i>S. sclerotiorum</i> .	111
R.2.1.- Liberación de dióxido de carbono a partir de sustratos radioactivos en micelio y efecto de inhibidores.	111
R.2.2.- Liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de sustratos radioactivos en extractos libres de células y efecto de inhibidores.	114
Discusión	
D.1.- Metabolismo de poliaminas en <i>S. sclerotiorum</i> .	115
D.2.- Relación del metabolismo de poliaminas con procesos de crecimiento y diferenciación de <i>S. sclerotiorum</i> .	120
Conclusiones	121
Comentario final	124
Bibliografía	125

INTRODUCCION GENERAL

I. 1.- *Sclerotinia sclerotiorum*.

I. 1. 1.- Ubicación taxonómica y ciclo de vida.

Este hongo pertenece a la División Eumicota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Discomycetes Orden Helotiales, Familia Sclerotiniaceae. El mismo se perpetúa en el suelo por medio de estructuras de resistencia denominadas esclerocios, las cuales se forman luego de la anastomosis y pérdida de agua por parte de las hifas. Los esclerocios pueden permanecer viables en el suelo durante muchos años, aunque existen organismos capaces de parasitarlos y disminuir su viabilidad. Condiciones de alta humedad favorecen la germinación de los esclerocios, la cual puede ocurrir en dos formas diferentes. En general, si la temperatura ambiente es superior a los 20 °C ocurre la germinación miceliogénica (Fig. 1), consistente en la formación de un micelio blanco algodonoso característico. El micelio así formado puede atacar las partes de la planta cercanas al suelo. Luego se producen esclerocios sobre los tejidos enfermos del hospedante y así se cierra la fase asexual del ciclo de vida del hongo (Fig. 1). La fase sexual del ciclo de vida se inicia con la germinación carpogénica de los esclerocios (Fig. 1), la cual ocurre cuando la temperatura es inferior a los 17 °C. Este tipo de germinación consiste en la formación de apotecios, que contienen a los ascos dentro de los cuales se forman las ascosporas. Las ascosporas son liberadas en forma de nubes livianas capaces de alcanzar las partes aéreas de las plantas hospedantes (Fig. 1). Las ascosporas germinan y colonizan tejidos senescentes (generalmente hojas o pétalos), los cuales son utilizados como fuente de nutrientes. El micelio formado invade entonces los tejidos vivos y así se inicia la enfermedad. En estadios avanzados de la infección, en los tejidos enfermos se forman esclerocios que caen al suelo, cerrando así el ciclo de vida del hongo (Fig. 1).

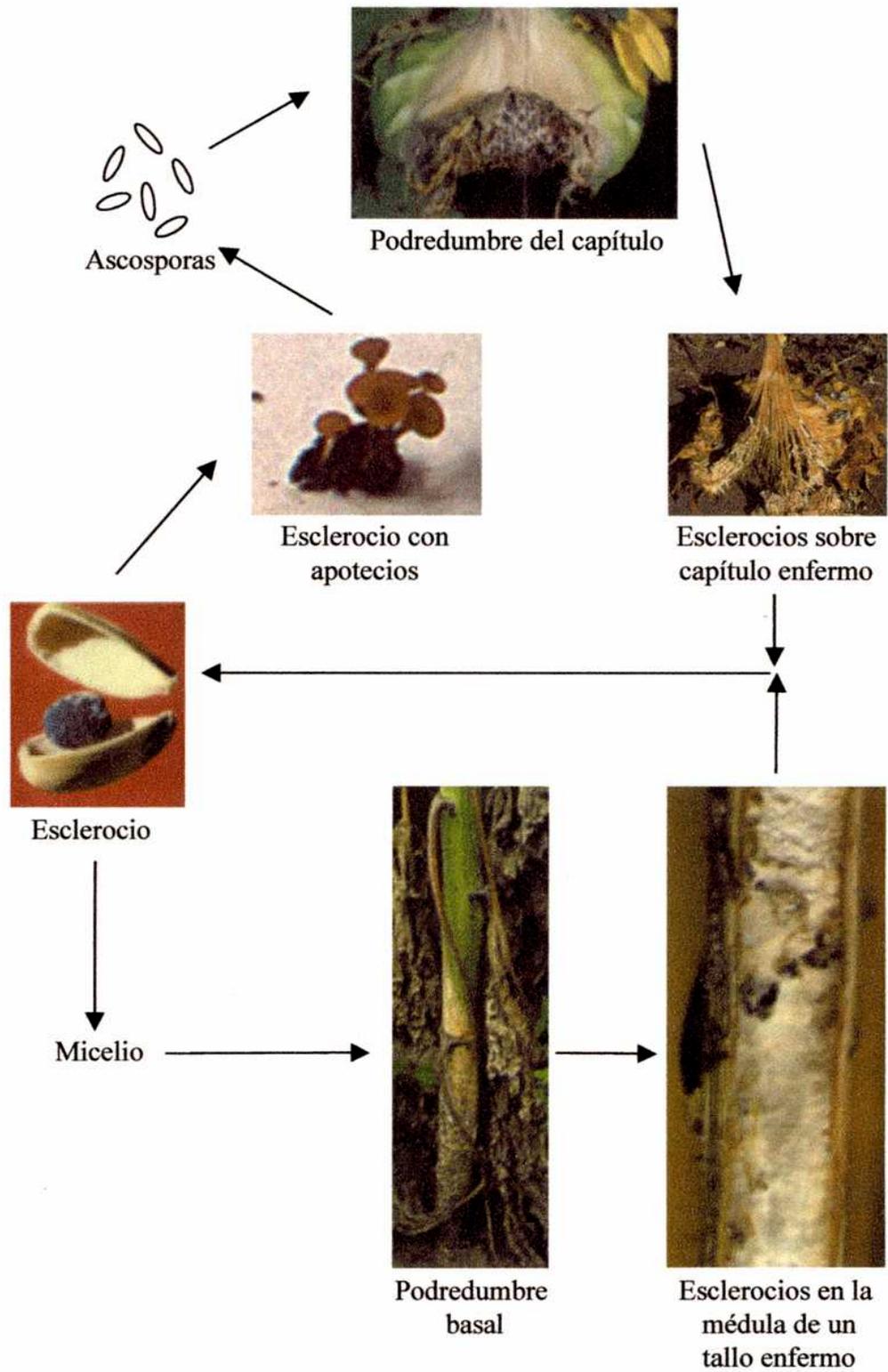


Figura 1.- Ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum* sobre plantas de girasol.

I. 1. 2.. Hospedantes y distribución geográfica.

Las enfermedades de plantas causadas por *S. sclerotiorum* revisten gran importancia debido a la presencia del mismo en zonas templadas, tropicales y subtropicales de todo el mundo (Purdy, 1979). Cada año se pierden varios millones de dólares por la reducción de los rendimientos y la calidad de las cosechas de las especies que son susceptibles a este patógeno (Zhou & Boland, 1998). Se trata de un patógeno de plantas extremadamente polífago, capaz de parasitar al menos 408 especies vegetales pertenecientes a 75 familias diferentes (Boland & Hall, 1994). Entre sus hospedantes se encuentran especies de gran importancia económica, tales como el poroto (*Phaseolus vulgaris*), la papa (*Solanum tuberosum*), la soja (*Glycine max*), el girasol (*Helianthus annuus*), el maní (*Arachis hypogaea*), la lechuga (*Lactuca sativa*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*), la frutilla (*Fragaria spp*) y el pimiento (*Capsicum anuum*).

I. 2.- El girasol: generalidades, ubicación taxonómica e importancia económica.

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una especie anual diploide con $n=17$ (Sackston, 1992), perteneciente al Orden Synandrales, Familia Compositae Adans., Subfamilia Tubuliflorae DC, Tribu Helianthae Cass., Género *Helianthus* L. Se trata de una de las oleaginosas más apreciadas a escala mundial. La calidad del aceite obtenido y el valor proteico de su harina hacen de este cultivo una alternativa interesante para los productores (Autino *et al.*, 1993). Argentina es el primer productor mundial y exportador de aceite y subproductos, lo cual representa una gran fuente de ingresos. En cuanto a su importancia económica, éste es el segundo cultivo de nuestro país después de la soja. Sin embargo, la producción se ha visto frecuentemente influida por problemas sanitarios que afectaron a los cultivos en forma directa como pérdida de producción, o en forma indirecta como temor a la siembra por falta de seguridad de cosecha. Las enfermedades más importantes del girasol en la Argentina son de origen fúngico, siendo *S. sclerotiorum* y *Verticillium dahliae*

los patógenos que causan mayores pérdidas actualmente (Pereyra & Escande, 1994).

I. 3.- Interacción *Sclerotinia sclerotiorum*- girasol.

S. sclerotiorum puede producir varias enfermedades en el girasol. El micelio resultante de la germinación miceliogénica de los esclerocios presentes en el suelo ataca la base de la planta. Por otra parte, las ascosporas resultantes de la germinación carpogénica de los esclerocios pueden atacar las partes aéreas tales como hojas, pecíolos, parte media del tallo, botón floral y capítulo. En los párrafos siguientes se describen las características de las dos enfermedades que revisten mayor importancia en la Argentina.

I. 3. 1.- Podredumbre basal.

I. 3. 1. 1.- Importancia.

Esta enfermedad ocurre en toda la región girasolera argentina aunque no alcanza la importancia que tiene en los Estados Unidos, Europa y la ex Unión Soviética, dado que el número de plantas atacadas resulta menor que en dichos países. La enfermedad frecuentemente lleva a la muerte de la planta y en los casos en que la planta no muere su rendimiento disminuye marcadamente, así como también el porcentaje de materia grasa de los frutos.

I. 3. 1. 2.- Sintomatología.

El micelio resultante de la germinación miceliogénica de los esclerocios invade la base del tallo y las raíces cercanas, dando origen a lesiones superficiales de color pardo. En estadios más avanzados de la infección, las lesiones se expanden y el micelio alcanza tejidos más internos, obstruyendo los vasos conductores y causando así la marchitez de la parte aérea y el vuelco de la

planta. La producción de ácido oxálico por parte del hongo y su precipitación en la forma de oxalato de calcio contribuyen a la obstrucción de los vasos conductores.

I. 3. 1. 3.- Tolerancia genética.

Aunque se ha demostrado la existencia de mecanismos genéticos de tolerancia a esta enfermedad (Gulya, 1985), en nuestro país no se ha trabajado demasiado en el tema, dado que la misma no ha producido mermas significativas de rendimiento.

I. 3. 2.- Podredumbre del capítulo.

I. 3. 2. 1.- Importancia.

Esta enfermedad ocurre en muchas zonas de la Argentina, pero los daños ocasionados por la misma han sido muy notables en el sudeste y sur de la provincia de Buenos Aires (Pereyra & Escande, 1994). La pérdida de producción por la caída de capítulos y la disminución de la calidad de la semilla debida a la presencia de esclerocios son las consecuencias más perjudiciales de esta enfermedad. La presencia de esclerocios no solo es perjudicial por tratarse de un cuerpo extraño, sino que también provoca un aumento de acidez en el producto cosechado, lo cual puede hacer que el mismo sea rechazado.

La magnitud de las pérdidas debidas a la podredumbre del capítulo ha sido variable entre temporadas, alcanzando niveles muy altos en las campañas 1987/88, oportunidad en la cual se registraron pérdidas totales en 50.000 hectáreas del sudeste de la provincia de Buenos Aires y disminuciones de un 50 % en el rendimiento en otras 100.000 hectáreas. De todas las enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum*, ésta es sin duda la más importante en la Argentina. Se puede considerar la enfermedad más perjudicial para este cultivo en el país, junto con el secado prematuro y quebrado de plantas provocado por *Verticillium dahliae*.

I. 3. 2. 2.- Sintomatología.

Las ascosporas resultantes de la germinación carpogénica de los esclerocios son diseminadas por el viento y alcanzan los capítulos. Las mismas germinan y dan origen a un micelio blanco en la superficie floral del capítulo. El micelio penetra los tejidos de modo que a los pocos días aparecen manchas de color marrón en el capítulo y las partes afectadas se ablandan notablemente. Si la enfermedad progresa, la lesión puede abarcar todo el capítulo, provocando su caída. Cuando la podredumbre alcanza los estadios más avanzados, se producen agregados de hifas que resultan en la formación de esclerocios.

I. 3. 2. 3.- Tolerancia genética.

Existen diferencias de comportamiento frente a esta enfermedad entre distintos cultivares (Pereyra *et al.*, 1991). Dentro de los híbridos comerciales usados en el país, la gran mayoría son susceptibles, mientras que un pequeño grupo presenta un cierto nivel de tolerancia, que se evidencia como un menor número de plantas enfermas ante ataques de intensidad moderada.

En general, la tolerancia del girasol a *S. sclerotiorum* parece ser poligénica (Vear & Tourvieille, 1988) y además es considerada un carácter diferente para cada una de las formas de ataque (Castaño *et al.*, 1993). Hasta el presente no se han identificado genes del girasol relacionados con la tolerancia a enfermedades provocadas por *S. sclerotiorum*. Vale la pena destacar la existencia de una correlación positiva directa entre la cantidad de ácido oxálico producido por distintos aislamientos de *S. sclerotiorum* y la virulencia de los mismos sobre plantas de girasol (Marciano *et al.*, 1983) y otros hospedantes tales como el poroto (Tu, 1985) y *Arabidopsis thaliana* (Dickman & Mitra, 1992). Además, se ha demostrado que plantas de tomate y tabaco genéticamente transformadas con un gen bacteriano que codifica para una enzima capaz de degradar el ácido oxálico, muestran un aumento en la tolerancia a la infección por *S. sclerotiorum* (Kesarwani *et al.*, 2000). Por lo tanto, es probable que el

mejoramiento genético de la capacidad del girasol de degradar esta toxina, resulte una aproximación interesante para aumentar la tolerancia de esta especie a las distintas enfermedades causadas por *S. sclerotiorum*.

I. 4. - Métodos tradicionales de lucha contra las enfermedades del girasol producidas por *S. sclerotiorum*.

Uno de los principales problemas que dificultan el control de las enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* es la permanencia de los esclerocios en el suelo durante varios años sin perder su capacidad infectiva. Cualquier método tendiente a disminuir la cantidad de esclerocios viables en el suelo puede contribuir a atenuar la incidencia de estas enfermedades. En este sentido, los tratamientos químicos del suelo no han dado resultados aceptables (Peres *et al.*, 1986). La rotación de cultivos con especies no susceptibles al ataque de *S. sclerotiorum* es una manera de dar tiempo a que los esclerocios pierdan viabilidad. Sin embargo, el amplio rango de hospedantes de este patógeno complica este tipo de prácticas. Una alternativa es la rotación con especies de gramíneas, las cuales en general no son susceptibles al ataque del patógeno. Una medida recomendable es controlar que las semillas usadas para sembrar no estén contaminadas con esclerocios. Para el caso de la podredumbre del capítulo en particular, la estrategia principal consiste en el uso de híbridos con altos niveles de tolerancia. De todas maneras, cuando ocurren ataques severos, las pérdidas de productividad resultan importantes aun cuando se trate de híbridos tolerantes. En el sudeste de la provincia de Buenos Aires se ha observado que las plantaciones sembradas tempranamente (octubre y principios de noviembre) en general han sido menos atacadas que las sembradas más tarde. Dado que el período de máxima susceptibilidad al ataque de *S. sclerotiorum* es en el comienzo de la floración, es probable que el efecto anteriormente descrito se deba a que en el caso de las siembras tardías la floración ocurre en un momento en que se dan condiciones ambientales favorables para la infección y el desarrollo de la enfermedad. De este modo, al menos en esta región de la provincia parece recomendable hacer siembras tempranas (Pereyra & Escande, 1994).

OBJETIVOS GENERALES

En un sentido amplio, el objetivo de este trabajo de tesis fue contribuir al conocimiento científico dentro de las siguientes áreas:

- Las interacciones entre plantas y hongos.
- Las interacciones entre hongos patógenos de plantas y otros que pueden ser usados como agentes de control biológico de las enfermedades causadas por los primeros.
- La fisiología de hongos patógenos de plantas.

Los estudios se llevaron a cabo en el patosistema *Sclerotinia sclerotiorum*-girasol, y se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar el potencial del hongo *Epicoccum purpurascens* como agente de control biológico de la podredumbre del capítulo de girasol causada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Estudiar las propiedades de los compuestos antifúngicos producidos por *E. purpurascens*, así como también el potencial de la aplicación de los mismos para el control de enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum*
- Estudiar el rol de las poliaminas en procesos de crecimiento y diferenciación que forman parte del ciclo de vida de *S. sclerotiorum* y son claves para la supervivencia y la capacidad de dicho hongo de infectar a sus hospedantes.

Los estudios realizados en relación a cada uno de estos temas se presentan en tres capítulos separados, en cada uno de los cuales se detallan objetivos puntuales.

CAPITULO I

Interacción *Epicoccum purpurascens*- *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* y el potencial del primero como agente de control biológico de la podredumbre de capítulos de girasol.

RESUMEN

Existen antecedentes acerca del control biológico de enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* en diversas especies vegetales. En el caso particular del girasol, los mismos se han orientado al control biológico de la podredumbre basal. Sin embargo, hasta el presente no existían antecedentes con respecto al control biológico de la podredumbre del capítulo. En otras especies vegetales, el hongo *E. purpurascens* ha demostrado tener un cierto potencial para el control de enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* en el filoplano. Sobre la base de estos antecedentes, decidimos evaluar la eficiencia del mismo para el control de la podredumbre de capítulos de girasol. Se obtuvieron varios aislamientos de dicho hongo y se estudió la interacción de los mismos con *S. sclerotiorum in vitro*, seleccionándose el aislamiento que inhibió el crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* en forma más notable. Se llevaron a cabo ensayos de control biológico pulverizando conidios de dicho aislamiento sobre la superficie floral de capítulos de girasol, los cuales fueron posteriormente inoculados con ascosporas de *S. sclerotiorum*. En condiciones de invernadero, los conidios de *E. purpurascens* dieron origen a una abundante cantidad de micelio, el cual colonizó la superficie floral de los capítulos. Este tratamiento redujo significativamente la incidencia de la podredumbre, alcanzándose una reducción aún mayor de la misma con aplicaciones dobles de conidios de *E. purpurascens*. Por otra parte, este último tratamiento atenuó significativamente la disminución de la productividad resultante de la infección con *S. sclerotiorum*. La severidad de la podredumbre no se vio reducida en ningún caso. El efecto diferencial sobre los parámetros de incidencia y severidad

sugiere que el mecanismo de acción de *E. purpurascens* sobre *S. sclerotiorum* depende de eventos que ocurren en estadios tempranos del desarrollo de la enfermedad. Teniendo en cuenta que el híbrido de girasol usado es altamente susceptible, el grado de protección logrado resulta interesante. De todas maneras, ensayos semejantes llevados a cabo en condiciones de campo no protegieron las plantas de girasol del ataque de *S. sclerotiorum*. En estas condiciones, la colonización de la superficie floral por *E. purpurascens* fue mucho menor que en condiciones de invernadero. La búsqueda de nuevos aislamientos de *E. purpurascens* capaces de colonizar en forma más eficiente la superficie floral de los capítulos en condiciones de campo podría contribuir a incrementar el potencial de este hongo como agente de control biológico de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *S. sclerotiorum*.

El estudio de la interacción entre ambos hongos *in vitro* demostró que no se producen interacciones de tipo parasíticas entre ambos. Durante la germinación de conidios, *E. purpurascens* no liberó al medio de cultivo compuestos antifúngicos capaces de inhibir la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*. Sin embargo, la germinación de ascosporas resultó inhibida cuando se hicieron germinar juntas esporas de ambos hongos. En conjunto, los resultados sugieren que en dicha etapa de su ciclo de vida *E. purpurascens* es más eficiente que *S. sclerotiorum* en la incorporación de algún nutriente. En el capítulo II se presentan evidencias de la producción de compuestos antifúngicos por parte del micelio de *E. purpurascens*, se describen algunas propiedades de los mismos y se discuten los posibles mecanismos responsables de los fenómenos de control biológico observados en el presente capítulo.

INTRODUCCION

I. 1.-Control biológico de enfermedades de las plantas.

I. 1. 1.- Generalidades.

Baker y Cook (1974) definen el control biológico como la reducción de la cantidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedante o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas. Dentro de la patología vegetal, esta disciplina ha despertado un gran interés en los últimos 20 a 30 años. Una de las razones de ello es la creciente preocupación por la contaminación ambiental y los riesgos de intoxicación resultantes del uso de pesticidas químicos. Además, existe un cierto número de patógenos que no son controlados satisfactoriamente por estos últimos (Cook, 1993), de modo tal que el control biológico tiene sentido por sí mismo, independientemente de las desventajas que presenta el control químico. Por ejemplo, el uso de la cepa K-84 de *Agrobacterium radiobacter* para el control biológico de la agalla de corona (Kerr, 1980) no reemplazó a ningún método químico de control, si no que resulta la única manera de controlar dicha enfermedad a un costo económico razonable. Los avances en la manipulación genética de microorganismos también contribuyen a aumentar el interés por las técnicas de control biológico de enfermedades, dado que permitirán mejorar a corto plazo los microorganismos usados como agentes de control biológico (ACB).

El campo de aplicación de las técnicas de control biológico es muy amplio y abarca enfermedades causadas por una gran variedad de patógenos y el control de las mismas por una variedad igualmente grande de agentes biológicos. El alcance de esta introducción está limitado a enfermedades causadas por hongos y bacterias y al control de las mismas por agentes del mismo tipo.

Algunas prácticas de control, tales como el cultivo en suelos supresivos (Schroth & Hancock, 1982), la rotación de cultivos (Cook & Baker, 1983) y la

aplicación de enmiendas orgánicas (Papavizas & Lumsden, 1980) se fundamentan en el manejo de las comunidades naturales de microorganismos. En muchos casos, éstas prácticas han dado buenos resultados. Sin embargo, el conocimiento existente al presente acerca de cómo usar dichas comunidades es limitado, lo cual originó una tendencia a la introducción de agentes de control biológico (Cook, 1993). En general, los agentes de control biológico introducidos tienden a persistir poco tiempo en los ambientes en los que naturalmente no están presentes, lo cual hace que deban ser aplicados repetidas veces. Lamentablemente este uso de los microorganismos hace que muchas veces se los consideren pesticidas y por lo tanto deban cumplimentar los mismos requisitos que estos últimos para su registro (Cook, 1993).

I. 1. 2.- Mecanismos de acción de agentes de control biológico.

Se han descrito cuatro mecanismos por los cuales un microorganismo puede actuar como agente de control biológico: parasitismo, competencia por nutrientes, antibiosis y protección cruzada.

I. 1. 2. 1.-Parasitismo.

Se describe como hiperparásitos a aquellos hongos capaces de parasitar a otros hongos. Los mismos pueden atacar hifas, estructuras formadoras de esporas o estructuras de resistencia de sus hospedantes. Algunos hiperparásitos tales como *Ampelomyces quisqualis* (parásito de agentes causales de mildius) y *Darluca filum* (parásito de agentes causales de royas) presentan un alto grado de especialización (Blakeman & Fokkema, 1982). Otros hongos, tales como algunos del género *Trichoderma*, parasitan a una gran variedad de especies fúngicas, incluyendo patógenos de plantas, mostrando de este modo un grado de especialización menor que el de las especies antedichas (Chet, 1987). Además del parasitismo, estas especies de *Trichoderma* presentan también algunos de los mecanismos antagónicos que se describen más adelante, lo cual ha contribuido a que sean muy estudiadas por su potencial como agentes de control

biológico (Chet, 1987). Aunque *Trichoderma* es considerado un hongo de suelo, también ha sido utilizado para el control biológico de enfermedades del filoplano (Dubos, 1984).

I. 1. 2. 2.-Competencia por nutrientes.

Tanto las raíces como las hojas liberan exudados que pueden ser aprovechados por la microflora presente sobre dichos órganos para crecer (Andrews, 1992). Los exudados de raíces contienen mayor cantidad de nutrientes que los exudados de las partes aéreas (Curl & Truelove, 1986). Por otra parte, en ambos ambientes se encuentra materia orgánica muerta del propio hospedante y también nutrientes exógenos que pueden ser consumidos por microorganismos. Por lo tanto, los antagonistas capaces de competir con patógenos por estos nutrientes pueden resultar agentes de control biológico interesantes.

Los patógenos foliares necrotróficos no especializados, tales como los de los géneros *Alternaria*, *Phoma* y *Botrytis* tienden a crecer saprofiticamente en el filoplano antes de la penetración del hospedante y para ello utilizan nutrientes exógenos presentes en partículas de tierra, en el agua de lluvia, etc (Andrews, 1992). Dichos nutrientes son consumidos durante la germinación de esporas, el crecimiento de micelio y la formación de apresorios. Además de los nutrientes exógenos, aquellos provenientes de los exudados de la planta, los que son lavados de las mismas por las precipitaciones y los que están presentes en el tejido senescente pueden contribuir al crecimiento de patógenos necrotróficos. En estos casos es factible que un organismo capaz de competir con el patógeno por dichos nutrientes pueda ejercer efectos de control biológico (Andrews, 1992). Contrariamente a lo descrito para los patógenos necrotróficos, los patógenos biotróficos tales como los causantes de royas y mildius tienen fases epifíticas relativamente cortas y por lo tanto no dependen de la presencia de nutrientes exógenos para la penetración. Por lo tanto, los antagonistas cuyos mecanismos de acción se basan únicamente en la competencia por nutrientes no son apropiados para controlar a este tipo de patógenos. En estos casos, la estrategia más apropiada es intentar usar agentes de control biológico

productores de antibióticos (Rytter, 1989) y en los casos en que un cierto nivel de incidencia de la enfermedad es aceptable se pueden usar hiperparásitos para reducir la esporulación del patógeno una vez que la infección ya se estableció (Sztejnberg *et al.*, 1989).

Si bien en los párrafos precedentes se hace referencia principalmente a patógenos del filoplano, las estrategias basadas en interferir con la fase saprofítica del ciclo de vida de patógenos pueden ser también aplicadas para el control de enfermedades causadas por hongos del suelo tales como *Rhizoctonia solani* (Papavizas & Lumsden, 1980).

I. 1. 2. 3.-Antibiosis.

Se considera a este mecanismo como una forma de antagonismo mediada por metabolitos específicos o no específicos, de naturaleza química muy diversa, capaces de interferir con el crecimiento u otras actividades metabólicas de microorganismos a concentraciones muy bajas. Muchos microorganismos usados como agentes de control biológico producen antibióticos cuando son cultivados *in vitro*, pero el rol de estos compuestos en el control biológico ha sido demostrado claramente solo en algunos casos (Fravel, 1988). Uno de los ejemplos más claros es el de la participación de la fenazina en el control del pietín del trigo mediado por *Pseudomonas fluorescens*. Esta bacteria controla eficientemente a *Gaeumannomyces graminis var tritici*, agente causal de la enfermedad. *P. fluorescens* produce fenazina, un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento *G. graminis in vitro* (Gurusiddaiah *et al.*, 1986). Tomashow *et al.* (1986) obtuvieron mutantes de *P. fluorescens* no productoras del antibiótico. Estas mutantes resultaron incapaces de inhibir el crecimiento de *G. graminis in vitro* y además fueron menos eficientes que las cepas salvajes en cuanto a su capacidad de controlar el pietín en ensayos en invernadero. La complementación de las mutantes con ADN de una biblioteca de cepas salvajes resultó en la recuperación de la capacidad de producción de fenazina y también de la eficacia como agentes de control del pietín. De esta manera quedó demostrada la importancia del fenómeno de antibiosis en este caso particular. De todas maneras, la antibiosis no es el único mecanismo antagónico que opera

en este caso, ya que las mutantes no productoras de antibiótico no pierden totalmente la capacidad de control biológico.

El ejemplo citado, así como otros semejantes en los que se demostró la importancia de la antibiosis en el control biológico de enfermedades (Gutterson *et al.*, 1986; Howell & Stipanovic, 1983), corresponden a patologías causadas por hongos del suelo. Muchos hongos del filoplano estudiados como ACB producen antibióticos *in vitro* (Blakeman & Fokkema, 1982), pero aún no se ha demostrado claramente la participación de dichos compuestos en el control de enfermedades *in planta*.

I. 1. 2. 4.-Protección cruzada.

Desde hace mucho tiempo se sabe que en algunos casos la resistencia de una planta a un patógeno determinado aumenta luego de la interacción con una cepa avirulenta del patógeno (Asher, 1978), con un microorganismo no patógeno estrechamente relacionado (Deacon, 1976) o bien con un patógeno diferente (Hunt *et al.*, 1996). En estos casos no se produce una interacción directa entre ambos microorganismos, sino que uno de ellos estimula de alguna forma los mecanismos de defensa de la planta, lo cual resulta en un aumento de resistencia. La protección de plantas de trigo contra el pietín causado por *G. graminis* es un ejemplo conocido desde hace bastante tiempo de este mecanismo antagonico. En este caso se lograron niveles significativos de control biológico usando cepas avirulentas del patógeno (Asher, 1978) así como también el hongo no patógeno *Phialophora radicola*, estrechamente relacionado con *G. graminis* (Gutteridge & Slope, 1978). Estos hongos protegen a gramíneas y cereales de la infección por parte del patógeno y este mecanismo de control probablemente esté ampliamente difundido en las comunidades naturales (Deacon, 1973). En estos casos de protección cruzada no se estudió en que forma resultaban inducidos los mecanismos de defensa de la planta. Con el correr del tiempo quedó claro que una respuesta común de algunas plantas a la infección con un patógeno capaz de provocar lesiones necróticas es la inducción de resistencia sistémica contra ataques posteriores. La resistencia inducida resulta en la inmunización de tejidos no infectados contra el patógeno inductor y

también contra un amplio espectro de patógenos durante un tiempo prolongado (Hunt, 1996). Dicha forma de resistencia inducida es conocida como resistencia sistémica adquirida o SAR (del inglés 'Systemic Acquired Resistance'). Las rizobacterias conocidas como PGPRs (del inglés 'Plant Growth Promoting Rhizobacteria') son capaces de inducir resistencia sistémica en varias especies vegetales, tales como el pepino (Wei *et al.*, 1991), el poroto (Alström, 1991), el tabaco (Maurhofer *et al.*, 1994), el clavel (Van Peer *et al.*, 1991) y *Arabidopsis thaliana* (Van Wees *et al.*, 1997). Para diferenciarla de la resistencia inducida por patógenos, se denomina resistencia sistémica inducida o ISR (del inglés Induced Systemic Resistance) a aquella inducida por PGPRs (Kloepper *et al.*, 1992). Además, los eventos moleculares y bioquímicos que ocurren en la planta después de la inducción de resistencia sistémica por PGPRs son diferentes de los que ocurren luego de la inducción por patógenos que causan lesiones necróticas (Van Wees *et al.*, 1997). La posibilidad de usar PGPRs como agentes de control biológico ha sido intensamente estudiada en los últimos años, habiéndose obtenido resultados promisorios en el control de enfermedades del pepino de origen bacteriano, fúngico y viral (Wei *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1995).

I. 1. 3.- Estrategias de control biológico.

Existen tres estrategias principales para el control biológico de enfermedades de plantas (Cook, 1993), las cuales consisten respectivamente en:

- a.- regular la población del patógeno en el ambiente, manteniéndola por debajo del umbral de daño económico.
- b.- impedir que el patógeno infecte la planta.
- c.- limitar el desarrollo de la enfermedad y la formación de nuevos propágulos del patógeno después de la infección.

La primera de las estrategias consiste en introducir un antagonista en el hábitat del patógeno, o aumentar de algún modo la población de antagonistas preexistentes, con el objetivo de destruir los propágulos del patógeno y /o evitar su formación. El control biológico de *Sclerotinia minor* mediado por *Sporidesmium sclerotivorum* es un ejemplo claro de este tipo de estrategia (Adams, 1990). La segunda estrategia, consiste en aplicar un antagonista capaz

de interferir con el proceso de infección antes del momento en que el patógeno llegue a estar en contacto con la planta (Kommendahl & Windels, 1981). Varios de los agentes de control biológico registrados en diversos países del mundo (Fokkema, 1996) fueron seleccionados sobre la base de esta estrategia, siendo la que ha dado mejores resultados hasta el presente. La tercera estrategia consiste en la aplicación de antagonistas sobre plantas en las cuales la infección ya se ha establecido. Si el antagonista limita el crecimiento y /o la esporulación del patógeno puede contribuir a reducir la virulencia de la enfermedad y la persistencia del patógeno en el ambiente. El uso del hiperparásito *Ampelomyces quisqualis* para el control de diversos mildius es un ejemplo de este tipo de estrategia (Sztejnberg *et al.*, 1989).

I. 1. 3. 1.- Estrategias de control biológico de enfermedades provocadas por *Sclerotinia sclerotiorum*.

En esta sección se resumen las distintas estrategias de control biológico de enfermedades provocadas por *S. sclerotiorum* que han sido estudiadas por otros autores. Las mismas se clasificaron en cinco grupos de acuerdo a la parte del ciclo de vida del patógeno que se ve afectada por los agentes de control biológico (Zhou & Boland, 1998).

I. 1. 3. 1. 1- Reducción de la cantidad de inóculo inicial.

Esta es la estrategia que ha sido más estudiada y su objeto es disminuir la viabilidad de los esclerocios de manera de reducir la cantidad de inóculo inicial. A partir de esclerocios, muestras de suelo y otros ambientes, varios autores han aislado distintos microorganismos y han evaluado su capacidad de parasitar esclerocios de *S. sclerotiorum*. Algunos de ellos han mostrado una gran eficacia en reducir el número de esclerocios viables tanto en condiciones controladas como en el campo. El micoparásito *Coniothyrium minitans* es un hongo muy ubicuo en el suelo y puede penetrar hifas y esclerocios por presión física y digestión enzimática (Huang & Kokko, 1987; Tu, 1984). Dentro del

esclerocio parasitado, las hifas de *C. minitans* crecen inter e intracelularmente, causando la destrucción de tejidos. En experimentos realizados en invernadero, la incorporación de este hongo al suelo resultó en una disminución significativa de la cantidad de esclerocios viables y los niveles de daño provocados por *S. sclerotiorum* en plantas de lechuga (Mc Quilken & Whipps, 1995). Algunas especies del género *Trichoderma* también han sido usadas para disminuir el número de esclerocios viables en el suelo. El potencial de estos hongos como agentes de control biológico es muy amplio y está siendo actualmente estudiado en muchos patosistemas (Zhou & Boland, 1998). En suelos inoculados con un aislamiento de *T. koningii* a razón de 10^8 conidios g^{-1} , el 100 % de los esclerocios de *S. sclerotiorum* resultaron parasitados y perdieron su viabilidad al cabo de 60 días en condiciones de campo (Dos Santos & Dhingra, 1982). Las bacterias que han sido estudiadas por su potencial para reducir la cantidad de esclerocios viables en el suelo incluyen a especies de los géneros *Pseudomonas* (Mc Loughlin *et al.*, 1992; Expert & Digat, 1995) *Bacillus* y *Acinetobacter* (Odejijono & Dragar, 1993). Algunos insectos del suelo también pueden parasitar esclerocios y disminuir su viabilidad (Anas & Reeleder, 1988) o bien actuar como vectores de micoparásitos (Whipps & Budge, 1993).

Aunque varios micoparásitos disminuyen significativamente la cantidad de esclerocios viables presentes en el suelo, muchas veces ésto no se correlaciona con un nivel efectivo de control de la enfermedad, probablemente debido a que la cantidad de inóculo remanente es suficiente para iniciar una epidemia (Zhou & Boland, 1998). Al respecto, sería útil contar con mayor información acerca de las cantidades mínimas de inóculo de *S. sclerotiorum* capaces de desencadenar epidemias.

I. 1. 3. 1. 2.- Reducción de la diseminación secundaria de inóculo.

Los esclerocios que se forman sobre un hospedante durante una epidemia contribuyen a aumentar la cantidad de inóculo que puede originar epidemias en temporadas siguientes. Algunos investigadores han estudiado la posibilidad de aplicar micoparásitos sobre plantas maduras de manera de reducir el número de esclerocios viables formados sobre y dentro de los tejidos

enfermos. *Coniothyrium minitans* parasitó los esclerocios formados dentro de raíces y tallos de plantas de girasol, reduciendo su viabilidad (Huang & Hoes, 1976). En poroto, la aplicación de *C. minitans* en hojas resultó en una disminución de la cantidad y viabilidad de los esclerocios formados después de la infección pero no atenuó los síntomas de podredumbre blanca (Trutmann *et al.*, 1982).

La estrategia de aplicar suspensiones de esporas de agentes de control biológico en el filoplano para disminuir la cantidad de esclerocios viables en ciclos siguientes parece ser más apropiada para el control de enfermedades provocadas por especies del género *Sclerotinia* en las que no estén involucradas las ascosporas. Esta estrategia ha resultado exitosa para el manejo de la podredumbre de la lechuga provocada por *Sclerotinia minor*. La aplicación del micoparásito *Sporidesmium sclerotivorum* sobre plantas de lechuga enfermas redujo la incidencia de la enfermedad en cinco ciclos consecutivos de cultivo (Adams & Fravel, 1990).

I. 1. 3. 1. 3.- Bloqueo de la infección en la rizosfera.

La protección de los tejidos de la raíz y la base del tallo ha sido evaluada como estrategia para prevenir el desarrollo de enfermedades provocadas por *S. sclerotiorum* en dichas partes de la planta. El tratamiento de semillas de girasol con cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* protegió a las plantas jóvenes de la podredumbre provocada por *S. sclerotiorum* (Expert & Digat, 1995), aunque el mecanismo de control que operó en este caso no está claro. Es probable que estrategias semejantes puedan ser aplicadas para el control de la podredumbre de la lechuga causada por *S. minor* (Zhou & Boland, 1998).

I. 1. 3. 1. 4.- Bloqueo de la infección en el filoplano.

En varios hospedantes, la colonización de hojas y flores senescentes es un paso importante durante la infección por *S. sclerotiorum*. Por lo tanto,

algunos intentos de control biológico se han basado en bloquear esta etapa del proceso de infección. Inglis & Boland (1990) demostraron que la microflora naturalmente presente en los pétalos de flores de poroto puede impedir el desarrollo de podredumbre causada por *S. sclerotiorum*. A partir de entonces, se ha evaluado el potencial de numerosos microorganismos del filoplano para competir con *S. sclerotiorum* por la colonización de los sitios de infección.

Tal como se describe más adelante, el uso de *Epicoccum purpurascens* ha mostrado resultados promisorios para el control de enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* en poroto (Zhou & Reeleder, 1989) y lechuga (Mercier & Reeleder, 1987), aunque el mecanismo de acción involucrado no ha sido elucidado. Algunos hongos aislados de flores de colza, tales como *Alternaria alternata* y *Cladosporium cladosporoides*, fueron evaluados como agentes de control biológico de la podredumbre blanca de porotos. Los mismos redujeron notablemente el desarrollo de síntomas en condiciones de invernadero (Mercier & Reeleder, 1987), pero en experimentos de campo los resultados fueron más variables (Inglis & Boland, 1992).

Algunas bacterias también han sido evaluadas como agentes de control biológico de enfermedades producidas por *S. sclerotiorum* en el filoplano. La aplicación de *Erwinia herbicola* sobre pétalos de flores de poroto redujo la colonización por parte de *S. sclerotiorum*, aunque disminuyó la incidencia de la enfermedad en solo uno de los tres ensayos de campo realizados (Yuen *et al.*, 1991). La eficacia de las bacterias como agentes de control biológico en el filoplano es afectada por los factores ambientales en mayor grado que la de los hongos filamentosos (Zhou & Boland, 1998). Supervivencia y colonización epifítica insuficientes son dos causas comunes de inefectividad de los antagonistas bacterianos, particularmente en condiciones de campo bajo presiones de inóculo de *S. sclerotiorum* moderadas o altas (Yuen *et al.*, 1991).

I. 1. 3. 1. 5.- Reducción de la virulencia.

El término hipovirulencia hace referencia a la baja virulencia de algunos aislamientos dentro de una población de patógenos. En algunos hongos tales como *Cryphonectria parasitica*, causante de la cancrrosis del castaño, la

hipovirulencia está asociada con la presencia de ácidos ribonucleicos de doble cadena ('dsRNAs', del inglés 'double-stranded RNAs') en las células del hongo (Choi & Nuss, 1992). La presencia de tales ácidos nucleicos se debe a la infección del hongo por virus, algunos de los cuales han sido clasificados dentro de la familia *Hypoviridae* (Zhou & Boland, 1998). El potencial de usar aislamientos hipovirulentos de hongos patógenos como agentes de control biológico reside en la posibilidad de transmitir la hipovirulencia desde estos aislamientos a los aislamientos virulentos. De este modo se esperaría reducir la virulencia promedio de la enfermedad. Se han encontrado aislamientos hipovirulentos de *S. sclerotiorum* sobre apio, uno de los cuales resultó ser portador de 'ds RNAs' (Boland, 1992). Los 'ds RNAs' fueron transferidos a cepas virulentas por anastomosis de hifas, luego de lo cual éstas se volvieron hipovirulentas. Aunque se han encontrado otros aislamientos de este patógeno portadores de 'ds RNAs', los mismos no han resultado hipovirulentos. Por lo tanto, la asociación entre la presencia de 'ds RNAs' y el fenotipo hipovirulento parece no ser un fenómeno general, sino específico para determinados tipos de 'ds RNAs'. A pesar del descubrimiento de un aislamiento hipovirulento de *S. sclerotiorum* capaz de transmitir dicho fenotipo a aislamientos virulentos, la diversidad de grupos de compatibilidad vegetativa (Ford *et al.*, 1995) y micelial (Kohli *et al.*, 1992) de esta especie complica el intento de usar dicho aislamiento como agente de control biológico (ACB).

I. 2.- *Epicoccum purpurascens*.

I. 2. 1.- Ubicación taxonómica, distribución geográfica y características ecológicas.

Este hongo pertenece a la División Eumicota, Subdivisión Deuteromicotina. El mismo ha sido aislado a partir de ambientes y lugares muy diversos. Se lo considera un saprótrofo y es común encontrarlo en tejidos senescentes de plantas, pero también ha sido aislado a partir de la superficie de tejidos jóvenes (Dickinson, 1967). Aunque puede colonizar la superficie de las

hojas al comienzo de la estación de crecimiento, el micelio penetra los tejidos de la hoja solamente una vez que comienza la senescencia de las mismas (Pugh & Buckley, 1971). Resulta de especial interés para este trabajo de tesis, el hecho de que se ha reportado la presencia de *E. purpurascens* en capítulos de girasol (Rodríguez *et al.*, 2000). En dicho trabajo se demostró que variedades susceptibles y tolerantes a la podredumbre del capítulo difieren en el tipo y la frecuencia de hongos saprófitos presentes en su antosfera.

Algunos saprófitos de hojas aceleran el proceso de senescencia y reducen la productividad de sus hospedantes (Fokkema, 1981; Smedegaard-Petersen & Tolstrup, 1986), pero efectos de este tipo no han sido reportados en el caso de *E. purpurascens* (Jachmann & Fehrmann, 1989). Es frecuente encontrar conidios de este hongo en el aire y además ha sido aislado a partir de muestras de suelo, especialmente en zonas boscosas y a partir de raíces de numerosas especies vegetales.

I. 2. 2.- *E. purpurascens* como agente de control biológico de enfermedades de plantas.

Varias características de este hongo lo hacen un candidato interesante a ser estudiado como ACB de enfermedades de plantas. Su presencia frecuente en el filoplano y su capacidad de consumir tejido vegetal senescente sin afectar el desarrollo normal de la planta son dos de ellas. Además, se ha reportado la producción de compuestos antifúngicos por parte de este hongo (Brown *et al.*, 1987; Burge *et al.*, 1976; Madrigal *et al.*, 1991), aunque el efecto de los mismos sobre el crecimiento de patógenos *in vivo* ha sido poco estudiado (Madrigal, *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1991). Varios autores han evaluado el potencial de este hongo como ACB de enfermedades de plantas causadas por hongos en diversas especies vegetales (Tabla 1). Todas estas experiencias tuvieron resultados interesantes, lográndose un cierto nivel de control de las enfermedades estudiadas en cada caso. En los trabajos relativos al control de enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* en lechuga y poroto, la aplicación de conidios de *E. purpurascens* redujo significativamente la incidencia de las mismas. Vale la pena destacar que las etapas tempranas de la infección de estos hospedantes son

semejantes a las que ocurren durante la infección de los capítulos de girasol, dado que las ascosporas invaden tejido senescente antes de atacar el tejido vivo.

Tabla 1.- *Epicoccum purpurascens* como agente de control biológico de enfermedades de plantas

Enfermedad	Agente causal	Hospedante	Referencia
Podredumbre gris	<i>Botrytis cinerea</i>	Poroto	Hannusch & Boland, 1996; Szandala & Backhouse, 2001
Cancrosis	<i>Cytospora cincta</i>	Duraznero	Royse & Ries, 1978.
Podredumbre morena del fruto	<i>Monilinia laxa</i>	Duraznero	Madrigal <i>et al.</i> , 1994.
Podredumbre post-cosecha	<i>Monilinia fructigena</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Manzano	Falconi & Mendgen, 1994.
Podredumbre blanca	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Lechuga	Mercier & Reeleder, 1987.
Podredumbre blanca	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Poroto	Zhou <i>et al.</i> , 1991; Zhou & Reeleder, 1989; Boland & Inglis, 1989.
Podredumbre morena	<i>Monilinia laxa</i> y <i>Monilinia fruticola</i>	Cerezo	Wittig <i>et al.</i> , 1997.
Cancrosis del tallo	<i>Rhizoctonia solani</i>	Papa	Chand & Logan, 1984.
Sarna	<i>Venturia inaequalis</i>	Manzano	Fiss <i>et al.</i> , 2000; Philion <i>et al.</i> , 1997

OBJETIVOS

- Obtención de aislamientos de *Epicoccum purpurascens*.
- Estudio de la interacción de los mismos con un aislamiento de *S. sclerotiorum in vitro*.
- Determinación del tipo de interacciones que ocurren entre ambos hongos *in vitro*.
- Selección del aislamiento de *E. purpurascens* capaz de inhibir el crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum in vitro* en forma más notable.
- Evaluación de su potencial para el control de la podredumbre de capítulos de girasol.

MATERIALES Y MÉTODOS

MM. 1.- Aislamiento de *S. sclerotiorum*.

El aislamiento usado para todos los experimentos realizados *in vitro* se obtuvo a partir de esclerocios formados sobre capítulos de plantas de girasol con podredumbre blanda, resultantes de una infección natural en un campo de la zona de Chascomús, Provincia de Buenos Aires. Los esclerocios fueron desinfectados superficialmente con lavandina (2 % de cloro activo), se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril y luego se colocaron en placas de APG, las cuales se incubaron a 20 °C durante una semana. Las colonias obtenidas se repicaron a APG y luego se conservaron a 4 °C por lapsos de 3 meses. Los esclerocios originales fueron conservados en un desecador a temperatura ambiente. Uno de los aislamientos obtenidos de esta manera fue depositado en la colección de hongos del IIB-INTECh (IFCC # 458/02).

MM. 2.- Cultivo *in vitro* de *S. sclerotiorum*.

MM. 2. 1.- Obtención de esclerocios.

Placas de Petri conteniendo APG fueron inoculadas con discos de micelio del hongo y se incubaron a 20 °C. Al cabo de 20 a 30 días se cosecharon los esclerocios formados.

MM. 2. 2.- Obtención de ascosporas.

Se incubaron esclerocios a 4 °C durante 40 días, luego de lo cual se colocaron en placas de Petri conteniendo arena estéril húmeda. Las placas se incubaron a 18 °C bajo luz fluorescente blanca (continua) hasta que se desarrollaron apotecios (30 a 40 días). Las ascosporas descargadas por los apotecios quedaron adheridas a la superficie interna de las tapas de las placas de

Petri y se conservaron a -20 °C hasta el momento de ser usadas. Las ascosporas conservadas de esta forma se mantuvieron viables durante al menos 8 meses.

MM. 2. 3.- Germinación de ascosporas.

Las ascosporas colectadas tal como se describió en la sección anterior se resuspendieron en agua destilada estéril, se agitaron en vortex y se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 x g. El pellet de esporas se resuspendió en buffer fosfato 25 mM pH 5 y se determinó la concentración de las mismas en una cámara de Neubauer. Luego se ajustó la concentración a $1,5 \times 10^4$ ascosporas ml^{-1} con el mismo buffer. Alícuotas de 20 μl de la suspensión fueron colocadas en placas 'multiwell' (Falcon 3912, Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA) y el volumen se ajustó a 40 μl . Las placas fueron selladas con Parafilm® y se incubaron a 22 °C. Después de 16 h se detuvo la germinación agregando 5 μl de formaldehído y se determinó el porcentaje de esporas germinadas al microscopio óptico. Cada ascospora se consideró germinada si el largo del tubo germinativo fue al menos dos veces mayor que el diámetro mayor de la misma. Cuando fue necesario, el largo del tubo germinativo se determinó usando un ocular micrométrico.

MM. 3.- Aislamiento de cepas de *E. purpurascens*.

Los aislamientos se obtuvieron en marzo del año 1996, en un campo sembrado con girasol, en la vecindad del campo del IIB-INTECh. Para ello, placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo APG fueron abiertas y expuestas al aire a un metro sobre el nivel del suelo durante 2 a 5 minutos. Las placas se incubaron a 22 °C en oscuridad durante 24 a 72 horas. Las colonias de aspecto semejante al descrito para *Epicoccum purpurascens* (Schol-Schwarz, 1959; Kilpatrick & Chilvers, 1981) se repicaron hasta obtener cultivos puros. La identidad de los aislamientos se confirmó en base a las características de las colonias, los esporodoquios y los conidios.

MM. 4.- Cultivo *in vitro* de *E. purpurascens*.

MM. 4. 1- Determinación de las condiciones de cultivo óptimas para la esporulación.

Se evaluó el efecto de la luz y la temperatura de incubación sobre la formación de esporas *in vitro*. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio APG. Las placas se inocularon con discos de micelio de 5 mm de diámetro del aislamiento IFCC 48/99 y se incubaron en las condiciones descritas en la tabla 2. El tiempo total de incubación fue de 10 días, luego de lo cual se estimó el porcentaje de la superficie de la colonia cubierta por esporodocios. Para las incubaciones con luz se usaron 3 tubos fluorescentes de luz día de 30 W separados entre sí por 5 cm y las placas fueron ubicadas a 25 cm por debajo de los mismos. Los tratamientos se llevaron a cabo por cuadruplicado.

Tabla 2.- Condiciones de incubación de *E. purpurascens*.

Tratamiento	Temperatura de incubación	Condiciones de iluminación
A	22 °C	Oscuridad permanente
B	22 °C x 48 h, 10 °C x 24 h, retorno a 22 °C	Oscuridad permanente
C	22 °C	Oscuridad x 48 h, luz x 4 h, retorno a oscuridad
D	22 °C	Ciclos alternantes de luz y oscuridad (16 h/ 8 h).

MM. 4. 2- Obtención de conidios.

El hongo fue cultivado en placas de APG a 20 °C bajo luz fluorescente blanca (16 horas de luz/ 8h oscuridad) durante 20 a 25 días. Se agregaron 5 ml de agua destilada estéril sobre cada colonia y se raspó la superficie de las mismas con una espátula estéril. De esta manera se obtuvo una suspensión de conidios. Los restos de micelio presentes en la misma fueron eliminados por filtración a través de 2 capas de gasa estéril. Los conidios fueron lavados dos veces por centrifugación (1.000 x g, 10 min). En caso de no ser usados inmediatamente después de su obtención, los conidios fueron secados bajo vacío durante 2 minutos y posteriormente conservados en un desecador a temperatura ambiente durante lapsos de tiempo inferiores a 30 días.

MM. 5.- Ensayos de antagonismo *in vitro*.

MM. 5. 1.- Interacción de colonias en placas de Petri.

Quince aislamientos de *E. purpurascens* obtenidos de acuerdo a lo descrito en la sección MM.3 fueron comparados entre sí con el objeto de seleccionar aquellos con mayor capacidad de inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum in vitro*. Discos de micelio (5 mm de diámetro) de cada aislamiento de *E. purpurascens* fueron ubicados a 2 cm del centro de una placa de Petri de 9,5 cm conteniendo APG. Cuarenta y ocho horas después se sembraron discos de micelio de *S. sclerotiorum* a 2 cm del centro de la placa en la dirección opuesta a *E. purpurascens*. Las placas se incubaron a 22 °C durante 48 a 96 horas. Al cabo de ese tiempo, se determinó el grado de inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum*. Se hicieron 3 repeticiones para cada aislamiento y el ensayo se realizó por duplicado. En estos ensayos, la cantidad de medio de cultivo usada fue pequeña, de manera que se obtuvo una fina capa del mismo que permitió la observación de la zona de interacción entre colonias al microscopio invertido.

MM. 5. 2.- Interacción de tubos germinativos derivados de esporas.

Se preparó una suspensión de ascosporas ($1,5 \times 10^4$ ascosporas ml^{-1}) en buffer fosfato 25 mM pH 5 con 5 % de glucosa. Alícuotas de 20 μl de esa suspensión fueron colocadas en placas 'multiwell' y luego mezcladas con diferentes volúmenes de una suspensión de conidios de *E. purpurascens* (8×10^4 conidios ml^{-1}) en el mismo buffer, de forma tal que la concentración final de conidios varió desde 0 a 40×10^3 conidios ml^{-1} en un volumen total de 40 μl . Las placas se incubaron a 22 °C durante 16 h y la germinación de esporas se detuvo agregando 5 μl de formaldehído. Se determinó el porcentaje de germinación de esporas y el crecimiento del tubo germinativo por observación al microscopio. El largo de los tubos germinativos se midió con un ocular micrométrico. Se contaron más de 120 ascosporas y 30 tubos germinativos. Las ascosporas se consideraron germinadas cuando desarrollaron tubos germinativos al menos dos veces más largos que el diámetro mayor de la ascospora. Se usó un diseño al azar con cuatro repeticiones. También se determinó el porcentaje de germinación y el crecimiento del tubo germinativo de los conidios de *E. purpurascens*. Dada la naturaleza multicelular de estos últimos, se los consideró germinados cuando desarrollaron al menos un tubo germinativo dos veces más largo que el diámetro de la espora. El experimento entero fue llevado a cabo cuatro veces.

Se realizaron experimentos semejantes en los que la germinación no se detuvo agregando formaldehído, sino por centrifugación a 1.000 x g durante 10 minutos. Se conservó el sobrenadante de cada uno de los pocillos y se usó para evaluar la presencia de compuestos antifúngicos en el mismo, en forma semejante a lo descrito más adelante para la evaluación del efecto de una fracción rica en compuestos antifúngicos (capítulo II, sección MM.2).

MM. 6.- Cultivo de plantas de girasol.

MM. 6. 1.- Material vegetal.

El híbrido G-100 de Dekalb, altamente susceptible a la podredumbre del capítulo (Pereyra *et al.*, 1991) fue usado para todos los experimentos.

MM. 6. 2.- Ensayos en invernadero.

Se sembraron semillas en macetas plásticas de 20 litros conteniendo una mezcla de tierra y perlita (5:1). Las macetas se mantuvieron en un invernáculo a 22 ± 5 °C, bajo luz natural y con un suplemento de luz de sodio (14/24 horas) a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta.

MM. 6. 3.- Ensayos a campo.

Se llevaron a cabo dos ensayos de campo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas de ADVANTA SEEDS (ex ZENECA Agrícola S.A.) situado en la localidad de Balcarce, provincia de Buenos Aires. Los mismos se realizaron en época de verano (diciembre a marzo). Las semillas se sembraron en parcelas de 6 m de largo por 4 filas de ancho. Las filas estuvieron separadas 70 cm entre sí y la distancia entre plantas fue de 30 cm.

MM. 7.- Determinación del potencial de *E. purpurascens* para el control de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *S. sclerotiorum*.

MM. 7. 1.- Ensayos en invernadero.

MM. 7. 1. 1.- Experimento 1.

Para este ensayo se usaron plantas cultivadas en invernadero tal como se describió en la sección MM.6.2. Las ascosporas usadas para éste y todos los ensayos de control biológico realizados fueron obtenidas a partir de esclerocios

recolectados de plantas de girasol enfermas en la estación experimental del centro de investigación de ADVANTA SEEDS (Balcarse). A partir del inicio de la floración (aproximadamente 55 días después de la siembra), el estado fenológico de los capítulos fue determinado diariamente y cada uno de ellos fue tratado cuando 3 a 6 hileras de flores entraron en anthesis. La aplicación de los tratamientos se realizó por aspersión con un pulverizador manual (3 a 4 ml por capítulo). Para ello se preparó una suspensión de conidios de *E. purpurascens* (4×10^5 conidios ml^{-1}) y se aplicó sobre los capítulos de dos grupos de plantas. Veinticuatro horas después de la aplicación de conidios, uno de los grupos de plantas (Tratamiento 1) fue inoculado con una suspensión de ascosporas de *S. sclerotiorum* en Tween 20 al 0,01 % en agua (3×10^6 ascosporas ml^{-1}). El otro grupo de plantas fue entonces tratado con Tween 20 al 0,01 % y se usó para determinar si la colonización de capítulos por *E. purpurascens* presenta algún efecto negativo (Tratamiento 3). Un grupo de plantas control fue tratado con Tween 20 al 0,01 % e inoculado con ascosporas 24 horas más tarde, como control de enfermedad (Tratamiento 2). En todos los casos, los capítulos se cubrieron con bolsas de plástico durante 6 días y se hicieron observaciones sobre el progreso de la enfermedad a diferentes tiempos después de la inoculación con *S. sclerotiorum*. Se determinó el número de plantas con síntomas y se definió la incidencia de podredumbre húmeda del capítulo como el porcentaje de plantas con síntomas. Los datos de incidencia fueron analizados usando un modelo lineal generalizado para una respuesta binomial y una función de ligamiento logístico. Por otra parte, para cada capítulo se determinó el porcentaje de lígulas, brácteas y la superficie del receptáculo con síntomas de podredumbre. La severidad de la podredumbre del capítulo se definió como el porcentaje promedio de tejido dañado. Para dicho cálculo, solamente se tuvieron en cuenta los capítulos con síntomas. Se hizo una transformación angular de los datos de severidad y luego se los sometió a un análisis de varianza. Se hicieron contrastes para comparar la incidencia y la severidad de la podredumbre en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. Se usó un diseño en bloques al azar con 20 plantas por tratamiento y 5 bloques.

MM. 7. 1. 2.- Experimento 2.

Se comparó la eficacia de aplicaciones simples y dobles de conidios de *E. purpurascens* como tratamientos preventivos de la podredumbre húmeda de capítulos. La aplicación simple de conidios (Tratamiento 1) se realizó como en el experimento descrito en el párrafo anterior. La aplicación doble de conidios (Tratamiento 3) consistió en una aplicación inicial semejante a la descrita en el experimento 1, seguida de otra aplicación 24 horas más tarde. Las plantas correspondientes al tratamiento 3 fueron inoculadas con ascosporas 48 horas después de la primera aplicación de conidios, cuando 7 a 10 hileras de flores habían entrado en anthesis. Dado que algunos autores sostienen que la susceptibilidad del girasol a la podredumbre del capítulo disminuye durante la maduración (Pierre & Regnault, com. pers.), se realizó un control de enfermedad diferente para cada uno de los tratamientos anteriores. Para ello se usaron dos grupos de plantas, en los cuales las aplicaciones de conidios previas a la inoculación con ascosporas fueron reemplazadas por aplicaciones simples (Tratamiento 2) y dobles (Tratamiento 4) de Tween 20 al 0,01 %. Del mismo modo, se usaron dos grupos de plantas como controles para evaluar si la aplicación de *E. purpurascens* ejerce algún efecto negativo sobre el desarrollo de los capítulos. En este caso, las plantas fueron tratadas con conidios como se describió en los tratamientos anteriores, pero no fueron inoculadas con ascosporas (Tratamientos 5 y 6). Finalmente, dos grupos de plantas fueron usados para estimar la productividad de plantas que no se encontraron expuestas al patógeno ni a *E. purpurascens*. Dichos grupos fueron tratados dos (Tratamiento 7) o tres veces (Tratamiento 8) con Tween 20 al 0,01 %, a intervalos de 24 horas. La incidencia de la podredumbre se analizó tal como se describió para el experimento 1. Los capítulos de las plantas sometidas a los distintos tratamientos fueron cosechados cuando llegaron a madurez (aproximadamente 35 días después del inicio de la floración) y se determinó el número total de semillas, el peso de 100 semillas y el porcentaje de semillas llenas correspondiente a cada capítulo. Los porcentajes de semillas llenas (previa transformación angular) y el peso de 100 semillas fueron sometidos a un análisis de la varianza. Se usó un diseño en bloques al azar, con 15 plantas por tratamiento y 3 bloques.

MM. 7. 2.- Ensayos a campo.

Para estos ensayos se usaron plantas cultivadas tal como se describió en la sección MM.6.3. Los tratamientos se iniciaron cuando 3 a 12 hileras de flores entraron en antesis (aproximadamente 66 días después de la siembra). Se realizaron 4 tratamientos. El tratamiento 1 consistió en la aplicación de conidios de *E. purpurascens* y la inoculación con ascosporas de *S. sclerotiorum* 24 horas más tarde. El tratamiento 2 consistió en la aplicación de Tween 20 al 0,01 % y la inoculación con ascosporas de *S. sclerotiorum* 24 horas más tarde. El tratamiento 3 consistió en la aplicación de conidios de *E. purpurascens* y Tween 20 al 0,01 % 24 horas más tarde. El tratamiento 4 consistió en dos aplicaciones de Tween 20 al 0,01 % separadas por un intervalo de 24 horas. Los tratamientos se aplicaron en forma semejante a lo descrito para los ensayos de invernadero. Se usó un diseño al azar con 20 repeticiones (plantas). Las observaciones se realizaron 35 días después de la inoculación con *S. sclerotiorum*. La incidencia y la severidad de la podredumbre de capítulos fueron determinadas tal como se describió en los ensayos de invernadero. Se hicieron análisis de dos vías para evaluar la existencia de diferencias entre los tratamientos 1 y 2. Se usó el test exacto de Fisher para el análisis de la incidencia y el test de Student para la severidad. Los dos experimentos fueron realizados en diferentes parcelas y fechas durante la misma estación.

RESULTADOS

R. 1.- Antagonismo entre *E. purpurascens* y *S. sclerotiorum* *in vitro*.

Se obtuvieron 15 aislamientos de *E. purpurascens* usando la metodología descrita en la sección MM.3. Se evaluó la existencia de interacciones antagónicas entre cada uno de dichos aislamientos y el aislamiento IFCC 458/02 de *S. sclerotiorum*.

R. 1. 1.- Obtención de conidios de *E. purpurascens*.

Para la realización de algunos de los ensayos descritos en las próximas secciones fue necesario disponer de conidios de *E. purpurascens*. Tanto el aislamiento seleccionado para llevar a cabo los ensayos de antagonismo y control biológico (IFCC 48/99) como muchos otros de los obtenidos inicialmente no formaron conidios cuando se los cultivó en oscuridad (Fig. 2a). Por lo tanto, se evaluó el efecto de distintas condiciones de incubación (luz y temperatura) sobre la formación de conidios *in vitro* de dicho aislamiento. Un cambio en la temperatura de cultivo, consistente en una incubación a 10 °C durante 24 h y el retorno a 22 °C (Tratamiento B) no favoreció la esporulación. Las colonias sometidas a este tratamiento no desarrollaron esporodoquios, pero presentaron una pigmentación diferente a la de los controles (Fig. 2b). La aplicación de un pulso luminoso de 4 h de duración a colonias cultivadas en oscuridad absoluta (Tratamiento C) resultó en la formación de esporodoquios en forma de anillos concéntricos (Fig. 2c). La cantidad de esporodoquios formados fue baja, al igual que la velocidad de maduración de los mismos. El cultivo en condiciones alternantes de luz y oscuridad (Tratamiento D) también indujo la formación de anillos concéntricos de esporodoquios (Fig. 2d), los cuales abarcaron entre el 40 y el 80 % de la superficie de las colonias. En este caso, al cabo de 10 días de incubación se obtuvo una cantidad abundante de esporodoquios que dieron origen a conidios maduros. Este último tratamiento fue elegido como procedimiento de rutina para la obtención de conidios de *E. purpurascens*.

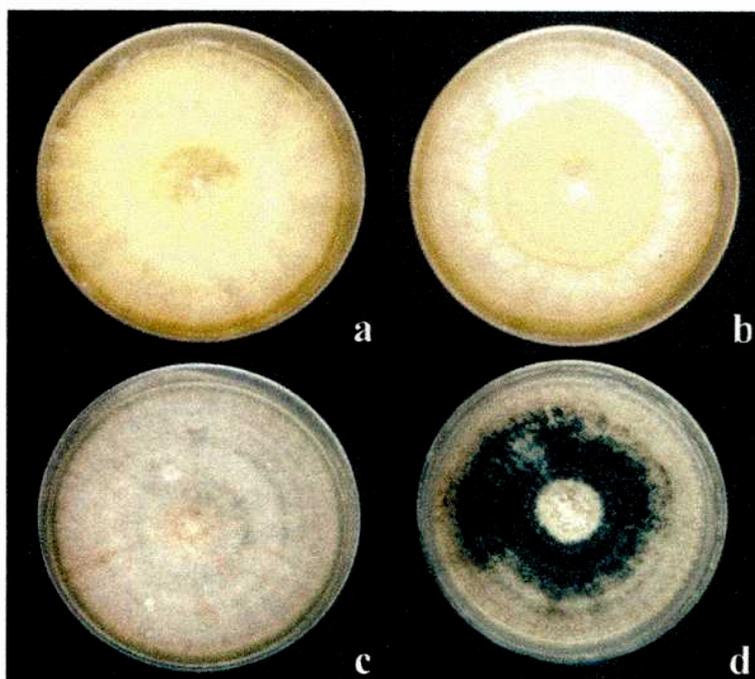


Figura 2.- Efecto de distintas condiciones de incubación sobre la esporulación de *Epicoccum purpurascens*.

a: 22 °C, oscuridad permanente.

b: 22 °C x 48 h, 10 °C x 24 h, retorno a 22 °C, oscuridad permanente.

c: 22 °C, oscuridad x 48 h, luz x 4 h, retorno a oscuridad.

d: 22 °C, ciclos alternantes de luz y oscuridad (16 h/ 8 h).

R. 1. 2. Interacción de colonias en placas de Petri.

R. 1. 2. 1.-Observación macroscópica.

En todos los casos, la velocidad de crecimiento de *S. sclerotiorum* fue mayor que la de los distintos aislamientos de *E. purpurascens*, por lo cual el primero siempre colonizó una mayor proporción de la superficie total de las placas, aun cuando las mismas hubieran sido inoculadas con *E. purpurascens* 24 horas antes. Los aislamientos de *E. purpurascens* difirieron en el tipo de interacción con *S. sclerotiorum*. En algunos casos (aislamientos 3, 7-10, 12-13) se produjo contacto entre las hifas de ambos hongos (Tabla 3). Otros aislamientos (1-2, 4-6, 11, 14-15) inhibieron el crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* antes de que hubiera contacto entre las colonias. De este modo, al cabo de 96 horas de iniciado el ensayo se produjo un halo de inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* en la zona próxima a las colonias de *E. purpurascens* (Fig. 3). El borde de las colonias de *E. purpurascens* presentó

una pigmentación intensa en la vecindad del halo de inhibición (Fig. 3). Dicho halo de inhibición persistió a lo largo del tiempo y en algunas ocasiones, la zona de inhibición fue posteriormente colonizada en forma parcial por micelio de *E. purpurascens*. En otras oportunidades, dicha zona nunca fue colonizada por micelio de ninguno de los hongos. Los efectos inhibitorios más notables fueron provocados por el aislamiento 5, el cual fue elegido para llevar a cabo las experiencias de control biológico que se escriben más adelante. Dicho aislamiento fue depositado en la colección de hongos del IIB-INTECh (IFCC), con el número 48/99.

Tabla 3.-Inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* por *E. purpurascens*

Aislamiento	Tamaño del halo de inhibición (mm)
1	1,9 ± 0,4
2	2,3 ± 0,5
3	0
4	2,1 ± 0,3
5	4,1 ± 0,5
6	3,1 ± 0,2
7	0
8	0
9	0
10	0
11	2,5 ± 0,5
12	0
13	0
14	2,8 ± 0,4
15	1,9 ± 0,2

Discos de micelio (5 mm) de cada aislamiento de *E. purpurascens* fueron ubicados a 2 cm del centro de una placa de Petri de 9,5 cm de diámetro conteniendo APG. Cuarenta y ocho horas después se sembraron discos de micelio de *S. sclerotiorum* a 2 cm del centro de la placa en la dirección opuesta a *E. purpurascens*. Las placas se incubaron a 22 °C durante 48 a 96 horas. Al cabo de ese tiempo, se determinó el tamaño del halo de inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum*, considerado como la distancia entre los bordes de las colonias de ambos hongos. Los resultados son los promedios de tres repeticiones ± DS.

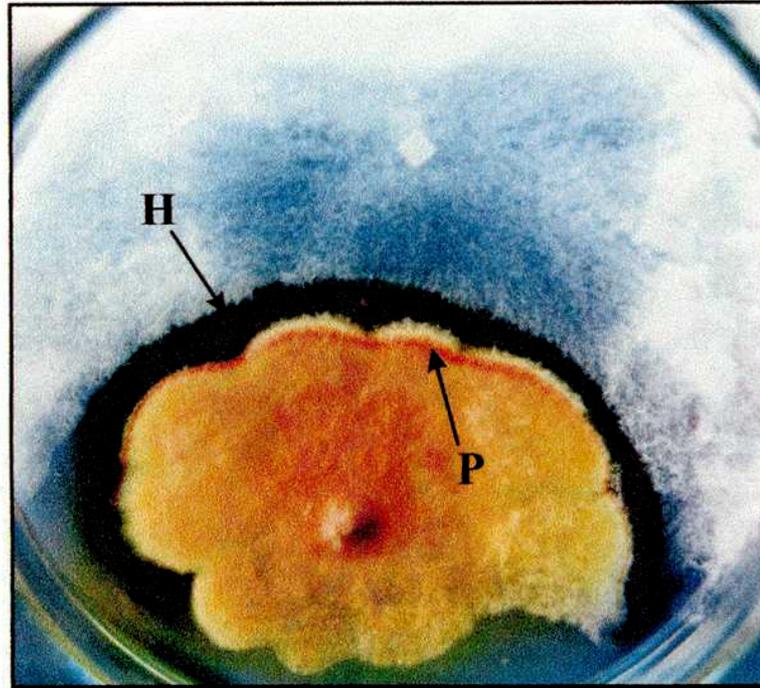
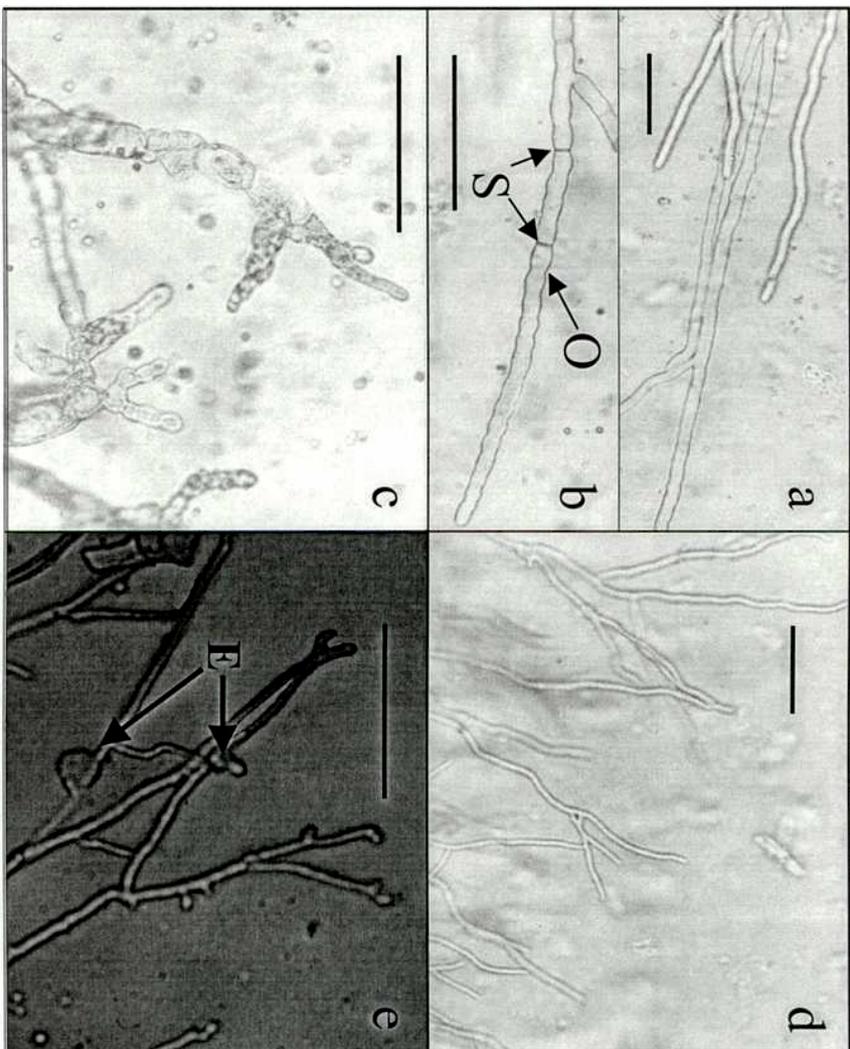


Figura 3.- Interacción de colonias de *E. purpurascens* y *S. sclerotiorum* *in vitro*. La colonia de *E. purpurascens* (abajo) muestra una línea de pigmentación intensa (P) en las vecindades del halo de inhibición (H) del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* (arriba).

R. 1. 2. 2.- Observación microscópica.

En las partes de las colonias de *S. sclerotiorum* adyacentes a las del aislamiento IFCC 48/99 de *E. purpurascens*, la morfología de las hifas resultó severamente alterada. En estadios tempranos de la interacción, las mismas presentaron una mayor segmentación (Fig. 4b) que las hifas de una colonia cultivada en ausencia de *E. purpurascens* (Fig. 4a). En estadios más avanzados, se formaron ramificaciones abundantes y ensanchamientos de las hifas, las cuales además se tornaron densas y refringentes (Fig. 4c). En las zonas de las colonias próximas a las de *S. sclerotiorum*, las hifas de *E. purpurascens* presentaron un mayor grado de ramificación (Fig. 4e) que las hifas de colonias cultivadas en ausencia de *S. sclerotiorum* (Fig. 4d). Además, en presencia de *S. sclerotiorum*, las hifas de *E. purpurascens* presentaron una gran cantidad de gotas de exudados (Fig. 4e).

Figura 4.- Interacción entre hifas de *E. purpurascens* y *S. sclerotiorum* *in vitro*.
a: hifas de una colonia de *S. sclerotiorum* cultivada en ausencia de *E. purpurascens*.
b: segmentación (S) y ondulaciones en forma de collar (O) de la pared celular de una hifa de una colonia de *S. sclerotiorum* cultivada en presencia de una colonia de *E. purpurascens*.
c: hifas de *S. sclerotiorum* mostrando abundante ramificación y deformación, cuando las colonias son cultivadas en presencia de *E. purpurascens*.
d: hifas de una colonia de *E. purpurascens* cultivada en ausencia de *S. sclerotiorum*.
e: hifas de una colonia de *E. purpurascens* mostrando gotas de exudados (E), cuando dicho hongo es cultivado en presencia de colonias de *S. sclerotiorum*.
 Barra= 10 mm



R. 1. 3.- Germinación de esporas e interacción entre tubos germinativos.

Al cabo de 16 h de incubación, la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum* en ausencia de conidios de *E. purpurascens* fue del 82 % y el largo promedio del tubo germinativo fue de 72 μm (Fig. 5a-b). Tanto la germinación como el crecimiento del tubo germinativo se vieron reducidos significativamente en presencia de conidios de *E. purpurascens* (Fig. 5a). El grado de inhibición de ambos procesos dependió de la cantidad de conidios presentes. La menor concentración de conidios usada (1×10^3 conidios ml^{-1}), la cual fue 15 veces menor que la concentración de ascosporas ($1,5 \times 10^4$ ascosporas ml^{-1}), fue suficiente para inhibir la germinación y el crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas en un 23 y un 20 % respectivamente (Fig. 5a). La mayor concentración de conidios usada ($1,5 \times 10^5$ conidios ml^{-1}) inhibió la germinación y el crecimiento del tubo germinativo en un 76 y un 69 % respectivamente (Fig. 5a-c). En los casos en los que el crecimiento del tubo germinativo de *S. sclerotiorum* resultó inhibido, no se detectaron anomalías en la morfología de los mismos.

En estos experimentos, en los que se usó un medio de incubación compuesto por buffer fosfato y glucosa (ver sección MM.5.2), no se observó la presencia de hifas de *E. purpurascens* enrolladas alrededor de las de *S. sclerotiorum* ni viceversa. Experimentos semejantes en los cuales la incubación se llevó a cabo en medios más ricos en nutrientes como caldo Czapek-Dox y caldo papa-extracto de levadura (CPELG) dieron resultados semejantes (datos no presentados). En todos los casos, el medio de incubación separado de las esporas por centrifugación y mezclado posteriormente con alícuotas de una suspensión de ascosporas, no inhibió la germinación de las mismas (datos no presentados). La germinación y el crecimiento de tubos germinativos de los conidios de *E. purpurascens* no fueron afectados por la presencia de ascosporas de *S. sclerotiorum* en ninguno de los experimentos.

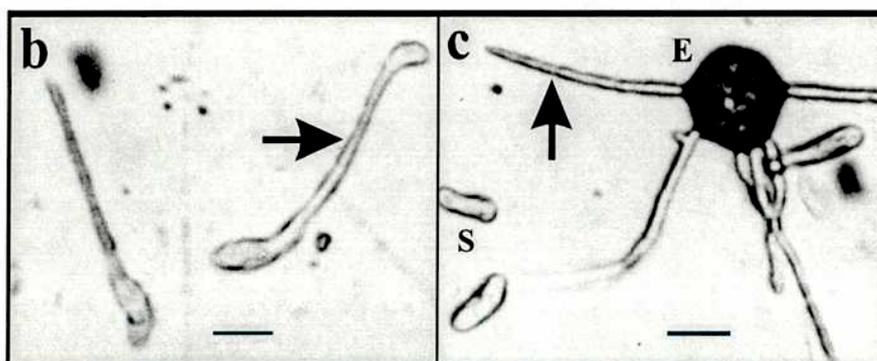
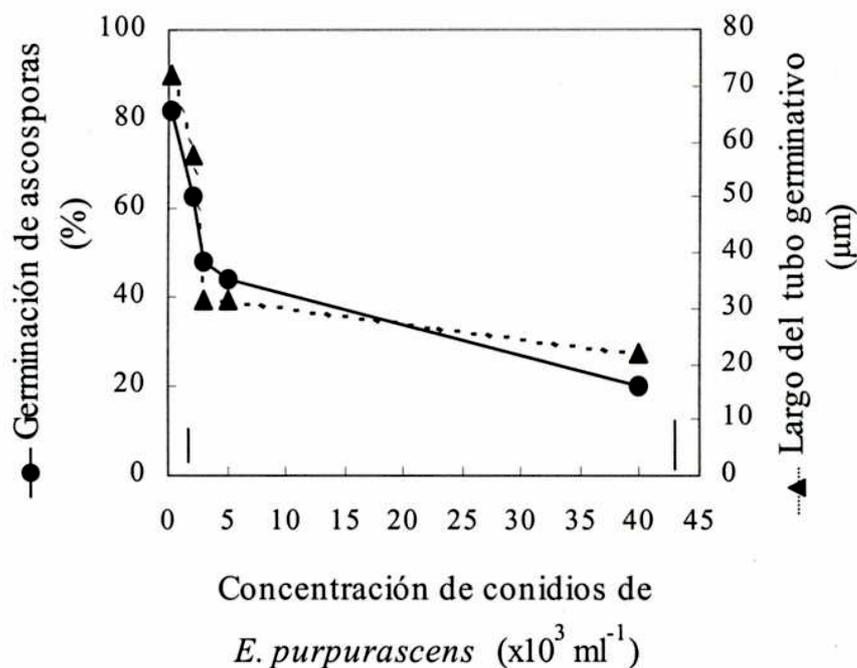


Figura 5.- Germinación de ascosporas y crecimiento de tubos germinativos de *S. sclerotiorum* en presencia de conidios de *E. purpurascens*.

a: las ascosporas de *S. sclerotiorum* (concentración = $7,5 \times 10^3$ ascosporas ml^{-1}) fueron incubadas en presencia de cantidades variables de conidios de *E. purpurascens* durante 16 horas. Las barras verticales representan los valores de la menor diferencia significativa ($P < 0,01$) para el porcentaje de germinación (izquierda) y el crecimiento del tubo germinativo (derecha).

b: ascosporas de *S. sclerotiorum* desarrollando tubos germinativos normales (flecha) en ausencia de conidios de *E. purpurascens*, barra = $10 \mu\text{m}$.

c: ascosporas de *S. sclerotiorum* (S) no germinadas, en presencia de un conidio de *E. purpurascens* (E) que desarrolló un tubo germinativo normal (flecha). Barra = $10 \mu\text{m}$.

R. 2.- *E. purpurascens* como agente de control biológico de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *S. sclerotiorum*.

La evaluación de la efectividad de *E. purpurascens* como ACB de la podredumbre húmeda del capítulo fue realizada en invernadero, bajo condiciones de cultivo controladas, así como también en condiciones de campo. En ambos casos se realizaron dos experiencias, cuyos resultados se describen a continuación.

R. 2. 1.- Ensayos en invernadero.

R. 2. 1. 1.- Experimento 1.

Las plantas inoculadas solamente con ascosporas de *S. sclerotiorum* (Tratamiento 2) mostraron síntomas típicos de podredumbre húmeda aproximadamente 5 días p.i.. Las hileras de flores exteriores resultaron cubiertas con micelio (Fig. 6a) y las lígulas fueron las piezas florales más afectadas en dicho momento (Fig. 6b). A los 7 días p.i., la incidencia fue del 88 % tanto en lígulas como en brácteas, mientras que la severidad fue del 52 y 17 % en lígulas y brácteas respectivamente (Tabla 4). Aproximadamente 10 a 12 días p.i., las lesiones se expandieron y alcanzaron el receptáculo (Fig. 6c). A los 14 días p.i., la incidencia y la severidad en el receptáculo alcanzaron valores de 78 y 63 %, respectivamente (Tabla 4). Ambos parámetros alcanzaron valores muy elevados (95 %) a los 21 días p.i. (Tabla 4), momento en el cual los capítulos mostraron un alto nivel de daño.

Un micelio compacto, amarillo pálido a rosáceo, se desarrolló sobre los capítulos tratados con conidios de *E. purpurascens* alrededor de 48 horas después de la aplicación de los mismos. Un anillo oscuro conformado por esporodoquios se formó en las hileras externas de flores 3 a 4 días después (Fig. 6d). El análisis microscópico de esporodoquios y esporas permitió confirmar que los mismos correspondían al hongo *E. purpurascens*. Las plantas tratadas solamente con *E. purpurascens* (Tratamiento 3) tuvieron una apariencia normal, sin síntomas evidentes de ningún tipo de daño.

En capítulos tratados con conidios de *E. purpurascens* antes de la inoculación con ascosporas de *S. sclerotiorum* (Tratamiento 1), el crecimiento de micelio de este último estuvo reducido a las hileras más internas de flores, o bien ni siquiera fue evidente. En este grupo de plantas, la incidencia de la podredumbre húmeda fue menor que en plantas controles para todos los tiempos estudiados (Tabla 4). Al final del experimento, la incidencia alcanzó el 95 % en las plantas controles (Tratamiento 2), mientras que en las correspondientes al tratamiento 1, dicho parámetro fue casi de la mitad (57 %, tabla 4).

El tratamiento con conidios de *E. purpurascens* (Tratamiento 1) fue efectivo en reducir la severidad de la podredumbre de brácteas 7 días p.i. ($P=0,015$) con respecto a las plantas usadas como control de enfermedad (Tratamiento 2). No se detectaron diferencias significativas en la severidad de la podredumbre entre ambos tratamientos en ninguno de los tiempos restantes, así como tampoco en lígulas a los 7 días p.i. (Tabla 4).

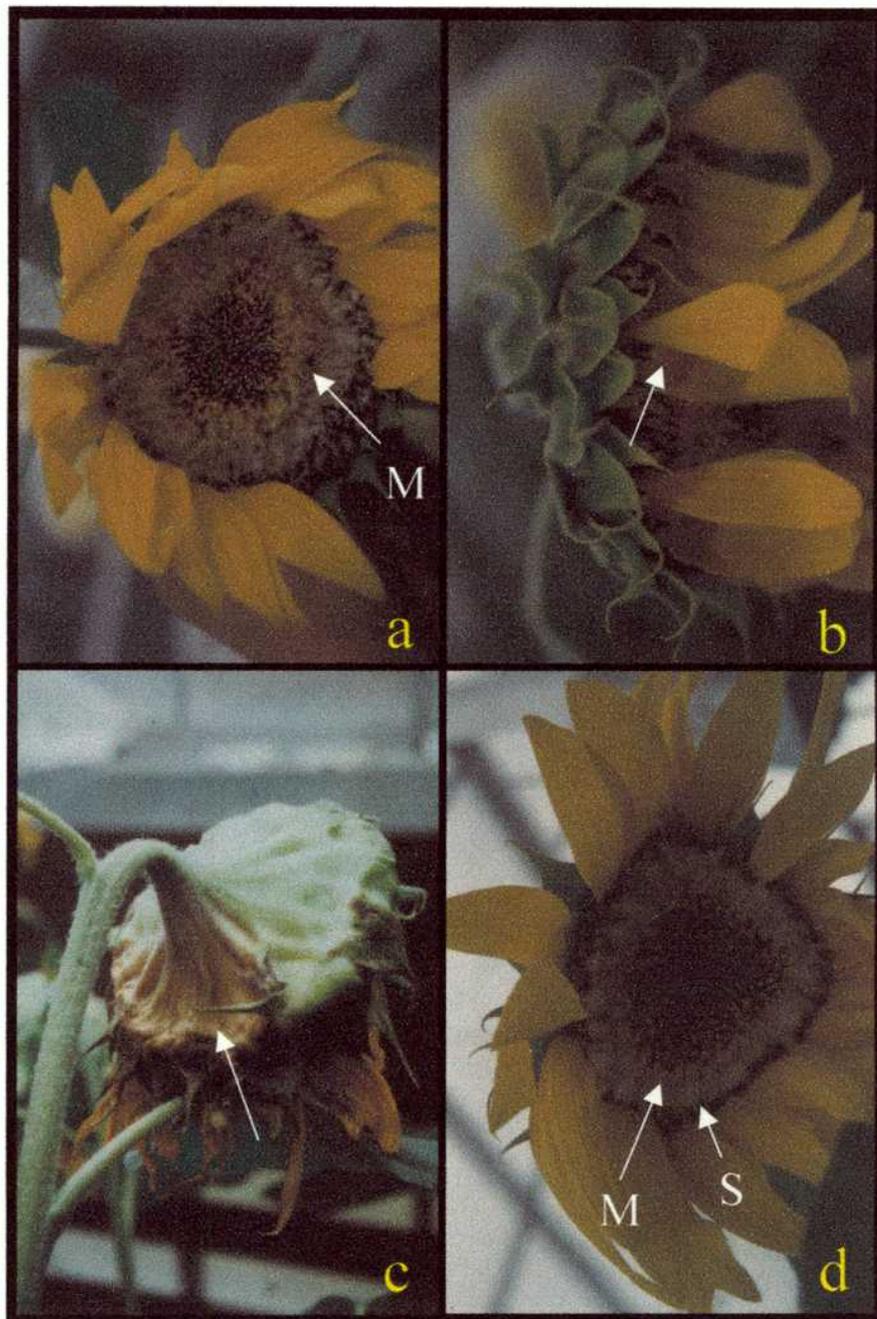


Figura 6. a.- Desarrollo de micelio (M) de *S. sclerotiorum* sobre la superficie de las hileras de flores externas de capítulos de girasol, 5 días p.i. b: podredumbre de la base de las lígulas (flecha), 5 días p.i. c: podredumbre del receptáculo (flecha), 12 días p.i. d: micelio amarillo pálido a rosáceo (M) y anillo de esporoquios (S) de *E. purpurascens*, desarrollados a las 48 horas de la aplicación de conidios sobre la superficie floral de los capítulos.

Tabla 4.- Efecto de la aplicación de conidios de *E. purpurascens* sobre la incidencia y la severidad de la podredumbre de capítulos de plantas de girasol cultivadas en invernadero.

Tratamiento	Lígulas (7 días p.i.)		Brácteas		Receptáculo (14 días (21 días p.i.))			
	I	S	I	S	I	S	I	S
1) <i>E. purpurascens</i> + <i>S. sclerotiorum</i>	32	16	15	12	43	84	57	95
2) 0,1ml/l Tween 20 + <i>S. sclerotiorum</i>	88	52	88	17	78	63	95	95
Contraste	valor de <i>p</i>							
1 vs 2	<0,001	0,015	<0,001	1,0	0,033	0,4	0,0028	1,0

Los tratamientos fueron aplicados cuando 3 a 6 hileras de flores de cada capítulo habían entrado en antesis. Todos los capítulos fueron inoculados con *S. sclerotiorum* 24 horas más tarde. La incidencia (I) fue definida como el porcentaje promedio de plantas con síntomas en la parte del capítulo considerada. Los datos fueron analizados usando un modelo lineal generalizado para una respuesta binomial y una función de ligamiento logístico. La severidad (S) fue definida como el porcentaje promedio de tejido dañado en la parte del capítulo considerada (se calculó teniendo en cuenta solamente las plantas con síntomas). Se hizo una transformación angular de los datos de severidad y luego se los sometió a un análisis de varianza. p.i.: post-inoculación

R. 2. 1. 2.- Experimento 2.

En este experimento, las plantas que se sometieron a una inoculación simple con *S. sclerotiorum* (Tratamiento 2) desarrollaron síntomas de podredumbre húmeda del capítulo (Tabla 5) en forma semejante a lo observado en el experimento 1. Del mismo modo, la aplicación de conidios de *E. purpurascens* resultó en la colonización de las hileras más externas de flores por el micelio de dicho hongo. Una aplicación simple de conidios (Tratamiento 1) resultó en una reducción significativa de la incidencia de la podredumbre, tanto a los 7 como a los 14 días p.i. (Tabla 5). En las plantas que recibieron aplicaciones dobles de conidios de *E. purpurascens*, el micelio de este último cubrió prácticamente todas las flores de cada capítulo a las 72 horas p.i.. El tratamiento 3, que consistió en una aplicación doble de conidios de *E. purpurascens* antes de la inoculación con ascosporas de *S. sclerotiorum*, resultó en una reducción aún mayor de la incidencia de la podredumbre para los dos tiempos de evaluación. De este modo, en las plantas correspondientes al tratamiento 3, la incidencia a los 7 días p.i. fue muy baja (6 %) en lígulas y nula en brácteas, mientras que en los controles de enfermedad (Tratamiento 4) dichos valores fueron de 81 y 44 % respectivamente (Tabla 5). En forma semejante, a los 14 días p.i., la incidencia de la podredumbre en las plantas correspondientes al tratamiento 3 fue de 25 % en lígulas y 19 % en brácteas, mientras que en los controles correspondientes (Tratamiento 4), dichos valores alcanzaron el 100 %. En todos los casos, las diferencias entre los tratamientos con conidios y los controles correspondientes fueron significativas (Tabla 5). La aplicación doble de conidios de *E. purpurascens* (Tratamiento 3) resultó en una reducción de la podredumbre húmeda mayor que la lograda con una aplicación simple (Tratamiento 1), para todos los tiempos estudiados (Tabla 5). A los 7 días p.i., en los controles de enfermedad la incidencia en lígulas y brácteas fue mayor ($P = 0,044$ y $P = 0,0027$, tabla 5) en las plantas que fueron inoculadas con *S. sclerotiorum* cuando sus capítulos tenían 7 a 10 hileras de flores abiertas (Tratamiento 4) que en las plantas usadas como control que fueron inoculadas cuando sus capítulos tenían 3 a 6 hileras de flores abiertas (Tratamiento 2). A los 14 días no se detectaron diferencias en la incidencia de la podredumbre entre ambos grupos de plantas control ($P = 1$, tabla 5).

Tabla 5.- Efecto de las aplicaciones simples y dobles de conidios de *E. purpurascens* sobre la incidencia de la podredumbre de capítulos de plantas de girasol cultivadas en invernadero.

Tratamiento	Lígulas	Brácteas	Brácteas	Receptáculo
	(7 días p.i.)		(14 días p.i.)	
1) <i>E. purpurascens</i> (S) + <i>S. sclerotiorum</i>	36	21	71	56
2) 0,1 ml/l Tween 20 (S) + <i>S. sclerotiorum</i>	100	93	100	100
3) <i>E. purpurascens</i> (D) + <i>S. sclerotiorum</i>	6	0	25	19
4) 0,1 ml/l Tween 20 (D) + <i>S. sclerotiorum</i>	81	44	100	100
Contraste	Valor de <i>p</i>			
1 vs 2	<0,001	<0,001	0,0090	<0,001
3 vs 4	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
1 vs 3	0,044	0,031	0,0021	0,040
2 vs 4	0,044	0,0027	1,0	1,0

Los tratamientos simples (S) fueron aplicados cuando 3 a 6 hileras de flores de cada capítulo entraron en antesis. Todos los capítulos fueron inoculados con *S. sclerotiorum* 24 horas más tarde. Los tratamientos dobles (D) consistieron en una aplicación inicial cuando 3 a 6 hileras de flores de cada capítulo habían entrado en antesis y una segunda aplicación 24 horas más tarde. Los capítulos fueron inoculados con *S. sclerotiorum* 24 horas después de la segunda aplicación. La incidencia fue definida como el porcentaje promedio de plantas con síntomas en la parte del capítulo considerada. Los datos fueron analizados usando un modelo lineal generalizado para una respuesta binomial y una función de ligamiento logístico. p.i.: post-inoculación.

R. 2. 1. 3.- Efecto de la aplicación de conidios de *E. purpurascens* y la infección por ascosporas de *S. sclerotiorum* sobre la productividad de plantas de girasol.

La productividad de las plantas usadas en el experimento 2 fue estimada sobre la base del porcentaje de semillas llenas y el peso de 100 semillas. En el grupo de plantas usado como control de productividad que recibió una aplicación doble de Tween 20 al 0,01 % (Tratamiento 7), el porcentaje de semillas llenas fue del 90 % y el peso de 100 semillas fue de 2,9 g (Tabla 6). La infección resultante de la inoculación con *S. sclerotiorum* cuando los capítulos tenían 3 a 6 hileras de flores abiertas (Tratamiento 2) resultó en una disminución severa del porcentaje de semillas llenas (0 %; $P < 0,001$) y el peso de 100 semillas (0,2 g; $P < 0,001$) con respecto a los controles de productividad (Tabla 6). El tratamiento que consistió en una aplicación simple de conidios de *E. purpurascens* (Tratamiento 1) atenuó los efectos negativos de la infección por *S. sclerotiorum* sobre el porcentaje de semillas llenas (12,4 %; $P = 0,038$), pero no atenuó los efectos negativos sobre el peso de 100 semillas (0,7 g; $P = 0,2$; tabla 6). En el grupo de plantas que fueron tratadas una vez con *E. purpurascens* pero no fueron inoculadas con *S. sclerotiorum* (Tratamiento 5), no se detectaron alteraciones significativas en el porcentaje de semillas llenas (84 %; $P = 0,6$) ni tampoco en el peso de 100 semillas (2,7 g; $P = 0,5$) con respecto a las plantas control que solamente fueron tratadas con Tween 20 al 0,01 % (Tabla 6).

La infección resultante de la inoculación con *S. sclerotiorum* cuando los capítulos tenían 7 a 10 hileras de flores abiertas (Tratamiento 2) disminuyó severamente el porcentaje de semillas llenas (0 %; $P < 0,001$) y el peso de 100 semillas (0,4 g; $P < 0,001$) con respecto a los controles de productividad (Tratamiento 8; 78 % y 2,4 g). Tal disminución de productividad fue atenuada sensiblemente por la aplicación doble de conidios de *E. purpurascens* (Tratamiento 3, tabla 6). Así, el porcentaje de semillas llenas (76 %) y el peso de 100 semillas (2,0 g) fueron significativamente mayores ($P < 0,001$) que en los controles de enfermedad (Tabla 6), llegando a valores cercanos a los de los controles de productividad (Tratamiento 8). La aplicación doble de conidios resultó más efectiva que la simple en cuanto a la atenuación de la disminución de productividad asociada a la podredumbre húmeda. Esto se aprecia al

comparar el porcentaje de semillas llenas ($P=0,0010$) y el peso de 100 semillas ($P=0,0020$) entre los tratamientos 1 y 3 (Tabla 6). Al igual que la aplicación simple de conidios, la aplicación doble (Tratamiento 6) no afectó negativamente la productividad de plantas no sometidas a inoculación con *S. sclerotiorum*. En este caso, el porcentaje de semillas llenas (91 %) y el peso de 100 semillas (2,2 g) no difirieron significativamente de los controles de productividad ($P=0,5$; tabla 6).

Tabla 6.- Efecto de las aplicaciones simples (S) y dobles (D) de conidios de *E. purpurascens* y la infección por ascosporas de *S. sclerotiorum* sobre la productividad de plantas de girasol cultivadas en invernadero.

Tratamiento	% semillas llenas	Peso de 100 semillas (g)
1) Tween 20 (0,1ml/l) (S)	90,0	2,9
2) Tween 20 (0,1ml/l) (S)+ <i>S. sclerotiorum</i>	0,0	0,2
3) <i>E. purpurascens</i> (S) + Tween 20 (0,1ml/l)	84,0	2,7
4) <i>E. purpurascens</i> (S) + <i>S. sclerotiorum</i>	12,4	0,7
5) Tween 20 (0,1ml/l) (D)	78,0	2,4
6) Tween 20 (0,1ml/l) (D) + <i>S. sclerotiorum</i>	0,0	0,4
7) <i>E. purpurascens</i> (D) + Tween 20 (0,1ml/l)	91,0	2,2
8) <i>E. purpurascens</i> (D) + <i>S. sclerotiorum</i>	76,0	2,0
Contraste	valor de p	
1 vs 3	0,6	0,5
1 vs 2	< 0,001	<0,001
2 vs 4	0,038	0,2
5 vs 7	0,5	0,5
5 vs 6	< 0,001	<0,001
6 vs 8	< 0,001	<0,001
4 vs 8	0,0010	0,0020

Ver detalles acerca de la aplicación de los tratamientos en la sección MM.7.1.2 y en la tabla 5. Los capítulos fueron cosechados 35 días después del inicio de la floración, se contaron las semillas y se determinó el porcentaje de las mismas que estaban llenas. Se eligieron 100 semillas al azar de cada capítulo y se pesaron. Los porcentajes de semillas llenas sometidos a una transformación angular y el peso de 100 semillas sin transformar fueron examinados mediante el análisis de la varianza.

R. 2. 2.- Ensayos a campo.

Las plantas inoculadas con *S. sclerotiorum* desarrollaron síntomas de podredumbre húmeda dentro de los 20 a 30 días p.i.. Contrariamente a lo observado en los experimentos realizados en invernadero, la aplicación de conidios de *E. purpurascens* no redujo la incidencia ni la severidad de la podredumbre húmeda en plantas cultivadas a campo que fueron inoculadas artificialmente con ascosporas de *S. sclerotiorum* (Tabla 7). Resultados semejantes fueron obtenidos en dos experimentos independientes, iniciados en distintas fechas. En estas condiciones, la colonización de la superficie floral de los capítulos por el micelio de *E. purpurascens* fue mucho menor que la observada en los experimentos realizados en invernadero, formándose solamente pequeñas matas de micelio sobre cada una de las flores.

Tabla 7.- Efecto de la aplicación de conidios de *E. purpurascens* sobre la incidencia y la severidad de la podredumbre de plantas de girasol cultivadas a campo

Tratamiento	Experimento 1		Experimento 2	
	I	S	I	S
1) <i>E. purpurascens</i> + <i>S. sclerotiorum</i>	100,0	71,2	84,2	68,1
2) Tween 20 (0.1ml/l) + <i>S. sclerotiorum</i>	88,9	71,2	81,0	60,7
3) Tween 20 (0.1ml/l) + <i>E. purpurascens</i>	17,6	n.d.	0,0	n.d.
4) Tween 20 (0.1ml/l)	5,6	n.d.	12,8	n.d.
Contraste	valor de <i>p</i>			
1 vs 2	0,5	1,0	0,8	0,4

Ver detalles acerca de la aplicación de los tratamientos en la sección MM.7.2. La incidencia (I) fue definida como el porcentaje promedio de plantas con síntomas en la parte del capítulo considerada. Los datos fueron analizados usando un modelo lineal generalizado para una respuesta binomial y una función de ligamiento logístico. La severidad (S) fue definida como el porcentaje promedio de tejido dañado en la parte del capítulo considerada (se calculó teniendo en cuenta solamente las plantas con síntomas). Se hizo una transformación angular de los datos de severidad y luego se los sometió a un análisis de varianza. n.d.: no determinado

DISCUSIÓN

En hospedantes tales como el poroto, la colonización de tejidos senescentes es un paso previo a la infección de tejidos sanos por parte de *S. sclerotiorum* (Boland & Inglis, 1989). De este modo, es de esperar que aquellos microorganismos capaces de usar tejidos senescentes como fuente de nutrientes pueden interferir con el desarrollo de enfermedades provocadas por dicho patógeno. Si tales microorganismos poseen además la propiedad de no afectar negativamente el desarrollo normal de la planta hospedante, entonces resultan candidatos interesantes a ser evaluados como agentes de control biológico (ACB) de esas enfermedades. *E. purpurascens* es un hongo saprófito que ha sido aislado a partir de tejidos senescentes de diversas especies vegetales a las cuales no les ocasiona daños (Jachmann & Fehrmann, 1989). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que este hongo es parte de la comunidad de microorganismos presentes en la antosfera de plantas de girasol (Rodríguez *et al.*, 2000). Otra característica interesante de *E. purpurascens* es su capacidad de producir compuestos antifúngicos durante el cultivo *in vitro*. Por estas razones este microorganismo ha sido evaluado como ACB de diversas enfermedades de origen fúngico, entre ellas las causadas por *S. sclerotiorum* en poroto y lechuga. En todos los casos, los autores obtuvieron un cierto grado de control de las enfermedades en cuestión, aunque no se determinó con precisión el mecanismo de acción de *E. purpurascens* como ACB. En este trabajo de tesis se evaluó el potencial de *E. purpurascens* como ACB de la podredumbre de capítulos de girasol, la enfermedad más importante de este cultivo en la Argentina. Además se estudió el mecanismo de acción del mismo como ACB. Para ello se obtuvieron aislamientos de dicho hongo en las inmediaciones de una plantación de girasol en la región de Chascomús. Se determinó la capacidad de cada uno de los aislamientos de inhibir el crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum in vitro*. De este modo, se seleccionó el aislamiento que provocó efectos inhibitorios más notables.

Ensayos de control biológico llevados a cabo con dicho aislamiento demostraron que *E. purpurascens* es capaz de colonizar la superficie floral de los capítulos de girasol luego de la aplicación de conidios, tanto en condiciones de ambiente controlado (ensayos en invernadero) como en condiciones de

campo. La colonización por parte del micelio fue acompañada por la formación de esporodoquios y conidios, lo cual podría contribuir a mantener el hongo presente sobre la superficie del capítulo (y en el medio ambiente en general) durante un tiempo prolongado. La colonización de los capítulos resultó en una gran reducción de la incidencia de la podredumbre húmeda causada por inoculaciones artificiales con ascosporas de *S. sclerotiorum* en ensayos en invernadero. Las aplicaciones dobles de conidios de *E. purpurascens* resultaron en una colonización aún mayor de la superficie floral de los capítulos, lo cual se correlacionó con un mayor grado de control de la incidencia de la podredumbre. Teniendo en cuenta que el híbrido de girasol usado en estos estudios es muy susceptible a la podredumbre del capítulo, los resultados obtenidos en los experimentos en invernadero son alentadores. Más aún, las condiciones de ensayo usadas fueron altamente favorables para el desarrollo de la enfermedad, incluyendo el alto número de ascosporas usadas para inocular cada capítulo, un hecho que difícilmente ocurra en condiciones naturales. La eficacia de la aplicación doble de conidios se vio reflejada no solo en la reducción de la incidencia de la podredumbre, sino también en una atenuación de las pérdidas de productividad, estimada en base al porcentaje de semillas llenas y el peso de 100 semillas. De este modo, las plantas que recibieron una aplicación doble de conidios de *E. purpurascens* antes de ser infectadas con *S. sclerotiorum* tuvieron una productividad semejante a la de los controles no inoculados con *S. sclerotiorum*, mientras que en las plantas que fueron inoculadas con *S. sclerotiorum* sin tratamiento previo, la productividad fue nula. Por otra parte, la presencia de *E. purpurascens* no afectó negativamente la productividad, ni tampoco se detectaron síntomas de ningún tipo de daño en las plantas tratadas solamente con este hongo. Estas características son importantes, dado que una condición necesaria para que un microorganismo pueda ser empleado como ACB es la de su inocuidad sobre la planta hospedante.

Sea cual fuere el mecanismo de control biológico involucrado, el hecho de que la colonización de capítulos por el micelio de *E. purpurascens* haya resultado en una reducción de la incidencia y no de la severidad sugiere que el mecanismo por el cual dicho hongo bloquea la infección ocurre en estadios tempranos de esta última. De este modo, en aquellos casos en que *S. sclerotiorum* puede sobrepasar la barrera inicial impuesta por *E. purpurascens*,

la enfermedad progresa con igual intensidad que en las plantas inoculadas con *S. sclerotiorum* solamente, sin que exista una atenuación de la severidad.

La inhibición de la germinación de ascoporas y el crecimiento del tubo germinativo de *S. sclerotiorum in vitro* en presencia de conidios de *E. purpurascens* podría deberse a la producción de compuestos antifúngicos por parte de este último, o bien a una mayor eficiencia en la incorporación de algún nutriente del medio de cultivo. Los filtrados libres de células de ambos hongos obtenidos a partir del medio en que se realizaron los ensayos de germinación no inhibieron la germinación de ascoporas y el crecimiento del tubo germinativo de ascoporas de *S. sclerotiorum*. De este modo, parece que al menos durante las primeras 24 horas (el tiempo que duró el ensayo de co-germinación), los conidios de *E. purpurascens* no liberan compuestos antifúngicos al medio de incubación. Por lo tanto, los efectos inhibitorios observados en estas condiciones probablemente se deban a la captura de algún nutriente por parte del micelio de *E. purpurascens*. De todas maneras, queda por determinar si opera un mecanismo semejante cuando esporas de ambos hongos se encuentran juntas en la antosfera. En el capítulo siguiente se muestran los estudios realizados con respecto a la producción de compuestos antifúngicos por *E. purpurascens* y se volverá a discutir acerca del rol desempeñado por los mismos en la interacción entre ambos hongos, integrando la información de dicho capítulo y la del presente. Teniendo en cuenta el nivel de colonización de la superficie floral alcanzado por el micelio de *E. purpurascens*, es probable que los efectos de control se deban a que el micelio de dicho hongo forma una barrera mecánica que impide que las ascoporas de *S. sclerotiorum* alcancen un ambiente favorable en la antosfera y de este modo las mismas no puedan iniciar la infección. Además, es probable que la gran cantidad de micelio de *E. purpurascens* también haya contribuido a disminuir la disponibilidad de nutrientes presentes en el tejido senescente, los cuales son necesarios para que ocurra la germinación de las ascoporas de *S. sclerotiorum*.

Por otra parte, los efectos de biocontrol observados en condiciones de invernadero podrían deberse a fenómenos de parasitismo. Zhou *et al.* (1991) reportaron la ocurrencia de enrollamientos de hifas de *E. purpurascens* sobre hifas de *S. sclerotiorum* y penetración de estas últimas cuando co-cultivaron micelio de ambos hongos *in vitro*, aunque resultó ser un fenómeno poco

frecuente. Por otra parte, Chand & Logan (1984) reportaron el parasitismo de hifas de *Rhizoctonia solani* por parte de *E. purpurascens*, y Brown *et al.* (1987) observaron que *E. purpurascens* puede parasitar hifas de *Phytophthora* spp y *Pithium* spp. En nuestro caso, no hemos detectado ninguna interacción de tipo parasítico, tanto en los ensayos en los que se co-incubaron esporas como en los que se enfrentaron colonias de ambos hongos. Vale la pena destacar que las colonias del aislamiento de *E. purpurascens* seleccionado para llevar a cabo los ensayos de control biológico se caracterizaron por inhibir el crecimiento de las colonias de *S. sclerotiorum* sin que se llegara a producir contacto entre las hifas de ambos hongos. De todas maneras, se llevaron a cabo observaciones semejantes usando algunos de los aislamientos de *E. purpurascens* cuyas hifas sí hicieron contacto con las de *S. sclerotiorum*, y en estos casos tampoco se observaron efectos de parasitismo (datos no mostrados). La ocurrencia de fenómenos de parasitismo podría ser favorecida en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. Por ello se llevaron a cabo ensayos de co-cultivo de ambos hongos en un medio pobre (agar-agua) y en este caso tampoco se encontraron evidencias de fenómenos de parasitismo (datos no mostrados). Por lo tanto, el parasitismo parece no ser un fenómeno frecuente en la interacción entre *E. purpurascens* y *S. sclerotiorum*. De todos modos, no se puede descartar la posibilidad de que ocurran fenómenos de este tipo *in planta*.

Contrariamente a lo observado en los ensayos realizados en invernadero, la eficacia de *E. purpurascens* como ACB de la podredumbre de capítulos fue nula en los ensayos realizados en condiciones de campo. En estas experiencias, la colonización de la superficie floral de los capítulos por parte del micelio de *E. purpurascens* fue mucho menor que en condiciones de invernadero. Es importante tener en cuenta que por razones prácticas, en este trabajo se ha usado un único aislamiento de *E. purpurascens*. La búsqueda de nuevos aislamientos de *E. purpurascens* bien adaptados a colonizar la superficie de capítulos bajo condiciones de campo podría contribuir a incrementar el potencial de este hongo como ACB de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *S. sclerotiorum*. Con respecto a esto, recientemente se ha informado sobre la presencia de *E. purpurascens* en capítulos de girasol (Rodríguez *et al.*, 2000). Resulta particularmente interesante que la frecuencia con que este hongo es encontrado en dicho micro-ambiente no es la misma en distintas variedades de

girasol. Por lo tanto, no resultaría extraño que existan cepas de *E. purpurascens* capaces de colonizar más eficientemente ciertas variedades. De este modo, la combinación de cepas de *E. purpurascens* y variedades de girasol probablemente sea un factor importante a tener en cuenta para futuros ensayos de control biológico de la podredumbre del capítulo.

CONCLUSIONES

- *E. purpurascens* es capaz de colonizar la superficie floral de los capítulos de girasol, tanto en condiciones de ambiente controlado (ensayos en invernadero) como en condiciones de campo.
- Bajo condiciones de cultivo controladas, la colonización de los capítulos por dicho microorganismo resulta en una reducción significativa de la incidencia de la podredumbre húmeda causada por *S. sclerotiorum*.
- Aplicaciones dobles de conidios son más efectivas que aplicaciones simples en cuanto a su capacidad de reducir la incidencia de la podredumbre, y además atenúan las pérdidas de productividad asociadas con dicha enfermedad.
- La aplicación de *E. purpurascens* no afecta negativamente la productividad, ni provoca síntomas de ningún tipo de daño en las plantas, lo cual es un rasgo importante para la formulación de agentes de control biológico.
- La infección de capítulos de girasol por *S. sclerotiorum* es bloqueada por *E. purpurascens* en estadios tempranos.
- El parasitismo no es un fenómeno frecuente en la interacción entre *E. purpurascens* y *S. sclerotiorum* *in vitro*.

- Durante la germinación, los conidios de *E. purpurascens* no liberan al medio de cultivo compuestos capaces de inhibir la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*.
- En condiciones de campo, la colonización de la superficie floral de los capítulos por parte del micelio de *E. purpurascens* es mucho menor que en condiciones de invernadero. En tales condiciones, la eficacia de *E. purpurascens* como ACB de la podredumbre de capítulos resulta nula.
- La búsqueda de nuevos aislamientos de *E. purpurascens* bien adaptados a colonizar la superficie de capítulos bajo condiciones de campo podría contribuir a incrementar el potencial de este hongo como ACB de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *S. sclerotiorum*.

CAPITULO II

Propiedades de los compuestos antifúngicos producidos por *Epicoccum purpurascens* y el potencial de su aplicación para prevenir enfermedades del girasol causadas por *Sclerotinia sclerotiorum*

RESUMEN

En este capítulo se demostró que el aislamiento de *E. purpurascens* usado para los ensayos de control biológico descritos en el capítulo I libera al medio de crecimiento compuestos capaces de inhibir el crecimiento de micelio y la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum in vitro*. El espectro de acción de los compuestos antifúngicos se extendió a diversos hongos patógenos de girasol, algunos de los cuales resultaron más sensibles que *S. sclerotiorum* a la acción de los mismos. La actividad biológica y otras propiedades de los compuestos antifúngicos dependieron fuertemente del pH, lo cual sugirió la presencia de grupos cuyo estado de ionización determina dichas propiedades. Distintas evidencias indicaron que los compuestos son producidos durante el crecimiento de micelio pero no durante la germinación de conidios de *E. purpurascens*. La germinación de conidios de *E. purpurascens* resultó muy sensible a la inhibición por parte de los compuestos antifúngicos, mientras que ocurrió lo contrario con el crecimiento de micelio. Estas evidencias sugirieron que los compuestos antifúngicos podrían otorgar una ventaja al micelio de *E. purpurascens* en la competencia con otros hongos por la colonización de sustratos, pero probablemente no desempeñen ningún papel durante la germinación de conidios de dicho hongo.

Por otra parte se evaluó el potencial de la aplicación de los compuestos antifúngicos como herramienta para el control de algunas enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum*. Dicha metodología no protegió a las hojas de la infección con discos de micelio, ni tampoco a los capítulos de la infección con ascosporas. *In vitro*, la estabilidad de los compuestos antifúngicos dependió

fuertemente del pH. Por lo tanto es probable que este factor haya contribuido a disminuir la actividad de los compuestos *in planta*. De todas maneras, el hecho de que una preparación rica en compuestos antifúngicos no haya atenuado el desarrollo de tales enfermedades, no implica que dichos compuestos no hayan formado parte de los mecanismos de control biológico de la podredumbre del capítulo descritos en el capítulo I. Además se discutió el posible rol de los compuestos antifúngicos en el control biológico de enfermedades y en la interacción de *E. purpurascens* con otros hongos *in planta*.

INTRODUCCION

Durante el estudio de la interacción entre *E. purpurascens* y *S. sclerotiorum in vitro* (capítulo I) se determinó que algunos aislamientos del primero inhibieron el crecimiento de micelio del segundo sin que se produjera contacto directo entre las colonias de ambos hongos. Tal fenómeno pudo haber resultado de la producción de compuestos antifúngicos por parte de *E. purpurascens* y su liberación al medio de cultivo en las vecindades de la colonia. Sin embargo, no se puede descartar que la inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* se debiera al agotamiento de algún nutriente como resultado de una mayor incorporación del mismo por parte de *E. purpurascens*. Por lo tanto, se decidió investigar si la inhibición se debió verdaderamente a la producción de compuestos antifúngicos.

Es sabido que *E. purpurascens* produce varios antibióticos. Uno de ellos es la flavipina (3,4,5-trihidroxi-6-metil-o-ftalaldehido), compuesto que fue originalmente aislado a partir de cultivos de *Aspergillus flavipes* por Raistrick & Rudman (1956) y fue posteriormente encontrado en cultivos de *E. purpurascens* por Bamford *et al.* (1961). Estos autores determinaron que la flavipina inhibió la germinación de esporas de *Botrytis allii* pero tuvo poca actividad antibacteriana, aunque no informaron las especies de bacterias sobre las cuales fue evaluado (Bamford *et al.*, 1961). Más recientemente, Madrigal *et al.* (1991) determinaron que la flavipina inhibió el crecimiento del hongo *Monilinia laxa in vitro* y además, su aplicación sobre plantas de duraznero disminuyó la infección por parte de dicho patógeno, agente causal de la podredumbre morena del fruto. En el mismo trabajo se demostró que el espectro de acción de este compuesto se extiende a una gran variedad de hongos y algunas bacterias que forman parte de la microflora de la filosfera del duraznero. A pesar de la variedad de compuestos antifúngicos producidos por este hongo, los estudios realizados en relación al potencial de los mismos para la prevención y el tratamiento de enfermedades de origen fúngico se han concentrado solamente en la flavipina. Más aún, en el caso particular de este compuesto, solamente se ha estudiado su potencial para el control de la podredumbre morena del duraznero (Madrigal *et al.*, 1991), pero no se ha estudiado su potencial para el control de otras enfermedades.

Las epiditiodicetopiperazinas, conocidas como epicorazinas A y B, son dos compuestos producidos por *E. purpurascens* que inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Baute *et al.*, 1978), pero su actividad antifúngica no ha sido evaluada. Otros compuestos producidos por *E. purpurascens* son las epirodinas, las cuales inhibieron el crecimiento de *Bacillus megaterium* (Burge *et al.*, 1976) y *Saccharomyces cerevisiae* (Ikawa *et al.*, 1978). Además se ha comprobado que *E. purpurascens* produce al menos otros tres compuestos antifúngicos cuya identidad no ha sido determinada aún (Brown *et al.*, 1987).

Por otra parte, este hongo produce y libera al medio de cultivo una variedad de compuestos de naturaleza diversa, los cuales podrían afectar el crecimiento de otros microorganismos. Entre ellos se encuentran pigmentos de tipo carotenoide (Gribanovski-Sassu & Foppen, 1967), cuya actividad antifúngica no ha sido evaluada. Además, se ha informado acerca de la producción de varios tipos de sideróforos por parte de *E. purpurascens*, algunos de los cuales no han sido descritos en otros organismos (Frederick *et al.*, 1981). También se ha descrito la producción de ácidos húmicos poliméricos, formados por sustancias fenólicas y aminoácidos (Burge *et al.*, 1976).

OBJETIVOS

- Determinar si los efectos antagónicos de *E. purpurascens* sobre el crecimiento de *S. sclerotiorum in vitro* observados en el capítulo I se debieron a la producción de compuestos antifúngicos por parte del primero.
- Estudio del espectro de acción de los compuestos antifúngicos sobre otros patógenos del girasol *in vitro*.
- Estudio del potencial de la aplicación de dichos compuestos como estrategia para el control de enfermedades del girasol provocadas por *S. sclerotiorum*.
- Determinar si los compuestos antifúngicos producidos por *E. purpurascens* pudieron haber desempeñado un papel importante en los fenómenos de control biológico de la podredumbre del capítulo descritos en el capítulo I.

MATERIALES Y METODOS

MM. 1.- Obtención de una fracción rica en compuestos antifúngicos (FRCA) producidos por *E. purpurascens*.

Se hicieron cultivos de *E. purpurascens* en erlenmeyers de 2 litros conteniendo 400 ml de medio Czapek-Dox líquido cada uno. Los cultivos fueron incubados a 22 °C con agitación (50 rev min⁻¹) durante 12 días. Los cultivos fueron filtrados por varias capas de gasa y luego por membranas con un tamaño de poro de 0,22 µm. El extracto crudo así obtenido fue concentrado bajo vacío a un décimo de su volumen inicial, en un evaporador rotatorio a 30 °C. Luego de ajustar el pH a 3 con HCl 5 N, el extracto concentrado fue sometido a cromatografía en fase reversa. Para ello, una columna octadecil de 3 ml (JT Baker Chemical Co, Phillipsburg, NJ) fue lavada con 6 ml de agua destilada y equilibrada con 6 ml de HCl 1 mM pH 3. Ocho mililitros de extracto crudo acidificado fueron pasados por la columna y recogidos a la salida de la misma (fracción A). La columna fue lavada con 6 ml de HCL 1 mM pH 3 (fracción B). Los compuestos retenidos en la columna fueron eluidos con 2 ml de metanol al 50 %. Esta fracción fue secada bajo vacío y el material remanente fue disuelto en buffer fosfato 25 mM pH 5 (50 ml por cada litro de medio de cultivo original). La solución obtenida fue denominada fracción rica en compuestos antifúngicos (FRCA).

MM. 2.- Determinación del efecto de la FRCA sobre el crecimiento de micelio y la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum* *in vitro*.

Crecimiento de micelio: discos de papel de filtro estériles fueron embebidos en alícuotas de 20 µl de la FRCA y depositados sobre la superficie de placas de agar Capek-Dox, a 2,5 cm del centro de la placa. Discos de papel

embebidos en buffer fosfato 25 mM pH 5 fueron usados como controles. Las placas se inocularon en el centro con discos de micelio. Luego de 48 a 96 horas de incubación se determinó la presencia de halos de inhibición en la periferia de la colonia. Se hicieron triplicados de cada placa

Germinación de ascosporas: alícuotas de 0, 2, 5, 10 y 20 μl de la FRCA fueron mezcladas con alícuotas de 20 μl de una suspensión de ascosporas ($1,5 \times 10^4$ ascosporas ml^{-1}) y se determinó el porcentaje de germinación de acuerdo a lo descrito en la sección MM.2.3 del capítulo I. Se hicieron triplicados para cada concentración. Ambos ensayos se realizaron dos veces.

MM. 3.-Determinación del efecto de la FRCA sobre la germinación de conidios de otros hongos patógenos del girasol.

Aislamientos de *Phoma macdonaldii*, *Verticillium dahliae* y *Alternaria helianthii* fueron proporcionados por la Dra. María Eugenia Bazzalo de la empresa Advanta Seeds (ex ZENECA Agrícola, SA). Además se usó un aislamiento de *Botrytis cinerea* (IFCC 377/00) de la colección de hongos del IIB-INTECh.

Todos los hongos fueron cultivados en placas de APG a 24 °C, excepto *A. helianthii*, el cual fue cultivado en ASG. Se obtuvieron conidios de cada uno de los hongos antedichos en forma semejante a lo descrito para *E. purpurascens*. Todas las esporas se resuspendieron en CPELG pH 5 (3×10^4 esporas ml^{-1}). Alícuotas de 0 a 30 μl de la FRCA se mezclaron con 10 μl de la suspensión de esporas y el volumen se ajustó a 40 μl con buffer fosfato 25 mM pH 5. La germinación de las esporas se detuvo a las 20 (*V. dahliae*, *A. helianthii* y *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*) o a las 30 (*P. macdonaldii*) horas de incubación y se determinó el porcentaje de germinación tal como se describió para las ascosporas de *S. sclerotiorum* en la sección MM.2.3 del capítulo I. El porcentaje de inhibición de la germinación se calculó de acuerdo a la fórmula descrita en la sección MM.6 del presente capítulo. Se hicieron triplicados para cada determinación y el experimento se hizo tres veces.

MM. 4.- Determinación del efecto de la FRCA sobre la germinación de conidios de *E. purpurascens*.

Se llevó a cabo en forma semejante a lo descrito en la sección anterior. Dado que los conidios de *E. purpurascens* son multicelulares, los mismos se consideraron germinados cuando emitieron al menos un tubo germinativo cuyo largo fuera superior al doble del diámetro de la espora (16/24 h).

MM. 5.- Determinación del efecto del pH sobre la retención de los compuestos antifúngicos en columnas de fase reversa.

Se obtuvo un filtrado del medio de crecimiento de *E. purpurascens* tal como se describió en la sección MM.1. El mismo se dividió en 5 alícuotas y cada una de ellas se llevó a distintos pHs en el rango de 3 a 8, con HCl o KOH, según fuera necesario. Cada una de las alícuotas se sembró en una columna octadecil (JT Baker Chemical Co, Phillipsburg, NJ) y se lavó la columna con agua. El resto del procedimiento realizado fue el que se describió en la sección MM.1, llevando en todos los casos el pH de la FRCA a 5 antes de determinar el efecto de la misma sobre la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*. Además se recolectó la fracción A obtenida a cada uno de los distintos pHs. El pH de dichas fracciones se ajustó a 5 y se determinó el efecto de las mismas sobre la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*. El porcentaje de inhibición de la germinación de ascosporas se determinó tal como se describe en la sección siguiente. Se hicieron triplicados para cada tratamiento y el experimento se realizó dos veces.

MM.6.- Determinación del efecto del pH sobre la actividad biológica de la FRCA.

Alícuotas de la FRCA (pH inicial =5) fueron llevadas a distintos pHs entre 3 y 9 con HCL 0,1 N o KOH 0,1 N según fuera necesario. Luego se determinó el efecto de cada una de esas alícuotas sobre la germinación de ascosporas tal como se describió en la sección MM.2.3 del capítulo I. Para hacer un control apropiado del efecto del pH sobre la germinación de las ascosporas,

se incubaron alícuotas de las mismas con buffer fosfato 25 mM a pHs entre 3 y 9. El porcentaje de inhibición de la germinación causado por la FRCA a cada pH se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición}_{\text{pHx}} = [100 - (\%G_{\text{FRCA pHx}} / \%G_{\text{control pHx}}) \times 100] ,$$

donde $\%G_{\text{FRCA pHx}}$ es el porcentaje de germinación de ascosporas incubadas con la FRCA al pH X y $\%G_{\text{control pHx}}$ es el porcentaje de germinación de ascosporas incubadas con buffer fosfato 25 mM al mismo pH. Se hicieron triplicados para cada tratamiento y el experimento se realizó tres veces.

MM.7.- Determinación del efecto de la aplicación de la FRCA sobre el desarrollo de podredumbre de hojas.

Se sembraron semillas de girasol en macetas de 2 l conteniendo una mezcla de tierra y perlita (5:1) y se incubaron en una cámara de cultivo a 24 ± 3 °C con luz fluorescente y luz de sodio (16/24 h). La humedad relativa ambiente fue del 65%. Los experimentos se realizaron cuando las plantas llegaron al estado de botón floral cerrado. En el primer experimento se trabajó con grupos de 4 plantas cada uno, mientras que en el segundo experimento se usaron grupos de 16 plantas. En cada experimento, dos grupos de plantas fueron tratados con la FRCA pulverizando 2 ml de la misma sobre la cara adaxial de una de las hojas del cuarto par. Un grupo de plantas control fue tratado en forma semejante con buffer fosfato 25 mM pH 5. Luego de 3 horas, uno de los grupos tratados con la FRCA y el grupo tratado con buffer fosfato fueron inoculados con *S. sclerotiorum*. Para ello, se depositó un disco de micelio (5 mm de diámetro) sobre la cara adaxial de las hojas, a 1 cm del ápice de las mismas. La zona inoculada se cubrió con papel de aluminio durante 6 horas y se determinó el largo de la lesión al cabo de 72 horas. El otro grupo de plantas tratadas con la FRCA fue usado como control de la fitotoxicidad de la FRCA. Los resultados se analizaron usando el test de Student.

MM. 8.- Determinación del potencial de la FRCA para el control de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *S. sclerotiorum*.

Las tareas correspondientes a este tema se llevaron a cabo como parte de uno de los experimentos (Experimento 1, sección MM.7.1.1) realizados en invernadero para estudiar el potencial de *E. purpurascens* como ACB de la podredumbre de capítulos (para el diseño experimental y la metodología empleada ver el apartado correspondiente en materiales y métodos del capítulo I). Un grupo de plantas fue tratado con la FRCA y luego de 2 h fue inoculado con una suspensión de ascosporas de *S. sclerotiorum* (tratamiento 1). Otro grupo de plantas fue tratado con la FRCA pero no fue inoculado con ascosporas, como control de fitotoxicidad de la FRCA (tratamiento 3). Un grupo de plantas control fue tratado con Tween 20 al 0,01% e inoculado con ascosporas 24 horas más tarde, como control de enfermedad (tratamiento 2). Este grupo de plantas es el mismo que se usó como control cuando se evaluó la eficiencia de *E. purpurascens* como ACB de la podredumbre del capítulo (Experimento 1, sección MM.7.1.1, capítulo I).

MM. 9.- Determinación del efecto del pH sobre la estabilidad de la FRCA.

Alícuotas de la FRCA (pH inicial =5) fueron llevadas a pH 3 o bien a pH 7 con HCL 0,1 N y KOH 0,1 N respectivamente. Entonces se incubaron a 25 °C durante distintos tiempos y luego el pH de las mismas se llevó a 5 nuevamente. Posteriormente se determinó el efecto de las distintas alícuotas sobre el porcentaje de germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*. Como control se usó buffer fosfato 25 mM pH 5. El porcentaje de inhibición de la germinación fue determinado mediante la fórmula citada en la sección MM.6. Se hicieron triplicados para cada tratamiento y el experimento se realizó dos veces.

RESULTADOS

R. 1.- Propiedades de los compuestos antifúngicos producidos por *E. purpurascens*.

Para determinar si *E. purpurascens* produce y libera compuestos antifúngicos al medio de crecimiento, se separó el sobrenadante de este último luego de cultivar al hongo tal como se describió en la sección MM.1. El uso de la cromatografía en fase reversa permitió separar los compuestos antedichos de las sales y la glucosa presentes en el medio de cultivo. Dado que ni la glucosa ni las sales poseen componentes hidrofóbicos en su estructura, las mismas no interactúan con la matriz hidrofóbica de la columna usada, y por lo tanto no quedan retenidas en ella durante la siembra y el lavado con HCl. Aquellas moléculas orgánicas producidas por el hongo que poseen componentes hidrofóbicos en su estructura interactúan con la columna y quedan retenidas. La aplicación de metanol a la columna permite desorber los compuestos retenidos. La evaporación del metanol y la redisolución del residuo obtenido en buffer fosfato permitió determinar la actividad biológica de dicha fracción (FRCA), entendiéndose a la misma como la capacidad de inhibir el crecimiento de micelio o bien la germinación de ascosporas. Los resultados de la evaluación de la actividad biológica de la FRCA se describen en las secciones siguientes.

R. 1. 1.- Efecto de los compuestos antifúngicos sobre el crecimiento de patógenos de girasol *in vitro*.

R. 1. 1. 1.-Crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum*.

El crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* se vio inhibido en las vecindades de discos de papel de filtro embebidos en 20 µl de la FRCA,

mientras que no ocurrió lo mismo en la vecindad de discos de papel embebidos en buffer fosfato 25 mM pH 5 usados como control (Fig 7).

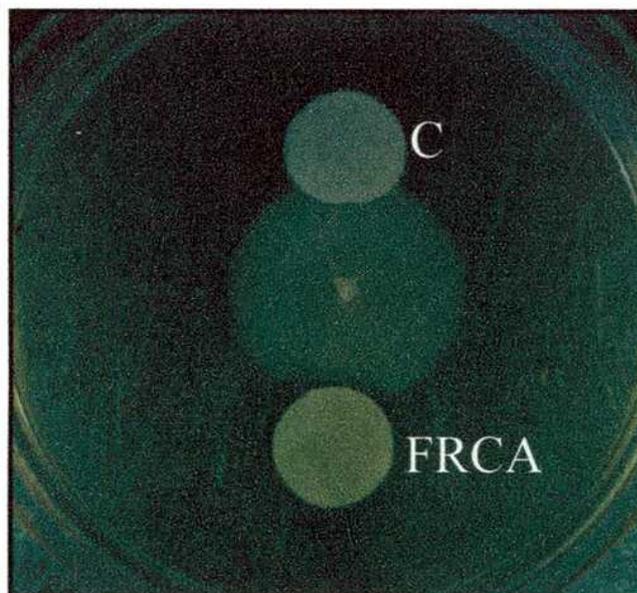


Figura 7.- Inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* por la FRCA obtenida a partir de cultivos de *E. purpurascens*. FRCA, disco de papel embebido en la fracción del mismo nombre; C, disco de papel control, embebido en buffer fosfato.

R. 1. 1. 2.-Germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum* y conidios de otros hongos patógenos.

La germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum* fue inhibida por la FRCA en forma dependiente de la dosis, inhibiéndose totalmente cuando se agregaron 20 μ l de la misma en cada pocillo (Fig. 8a). A los fines de estudiar el espectro de acción de los compuestos antifúngicos, se estudió el efecto de la FRCA sobre la germinación de conidios de otros hongos patógenos del girasol. La germinación de conidios de *Phoma oleracea*, *Alternaria helianthii*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis cinerea* también fue inhibida en forma dependiente de la dosis de FRCA (Fig. 8a). De todas maneras, se detectaron diferencias en la sensibilidad a la FRCA entre los distintos hongos. Por un lado, *P. oleracea*, *A. helianthii* y *V. dahliae* fueron los hongos en los cuales la

germinación resultó inhibida en forma más severa, siendo los efectos muy parecidos en todos ellos (Fig. 8a). Por otro lado, la germinación de conidios de *B. cinerea* fue afectada en forma menos notable, mostrando una susceptibilidad semejante a la de las ascosporas de *S. sclerotiorum* (Fig 8a). A concentraciones tales que la germinación de esporas de *S. sclerotiorum* y *B. cinerea* se vio inhibida en forma parcial, la morfología de los tubos germinativos de ambos hongos se vio frecuentemente alterada. Se detectó un aumento del grado de ramificación y la cantidad de tabiques intercelulares de los mismos. Las figuras 8.b-c muestran el aspecto de los tubos germinativos de *B. cinerea* en esas condiciones, mientras que los de *S. sclerotiorum* mostraron alteraciones semejantes a las de las hifas del mismo hongo cuando fue co-cultivado con micelio de *E. purpurascens* (Fig. 4, sección R.1.2.2, capítulo I).

R. 1. 2.- Efecto sobre la germinación de conidios de *E. purpurascens in vitro*.

Luego de 16 horas de incubación, cada uno de los conidios de *E. purpurascens* desarrolló varios tubos germinativos (Fig. 9b). La germinación de los mismos fue inhibida por la FRCA en forma dependiente de la dosis (Fig. 9a). La magnitud de la inhibición causada por la FRCA fue muy superior a la que causó sobre la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*, ya que 6,5 μ l de dicha fracción fueron suficientes para inhibir totalmente la germinación de conidios de *E. purpurascens* (Fig. 9a). En este experimento se incluyeron las ascosporas de *S. sclerotiorum* como referencia. La sensibilidad de la germinación de conidios de *E. purpurascens* a la inhibición por parte de la FRCA fue semejante a la de *P. oleracea*, *A. helianthii* y *V. dahliae* (comparar figuras 9 y 8). Por otra parte, los efectos de la FRCA no se limitaron a la inhibición de la formación de tubos germinativos normales. Se observó además la proliferación de células alrededor de los conidios, probablemente como consecuencia de la segmentación de tubos germinativos incipientes. A tiempos más largos, la germinación de los conidios usados como controles prosiguió en forma normal, dando origen a abundante micelio. Los conidios tratados con la FRCA, por el contrario, se mantuvieron en el mismo estado que presentaron a las 16 horas de incubación.

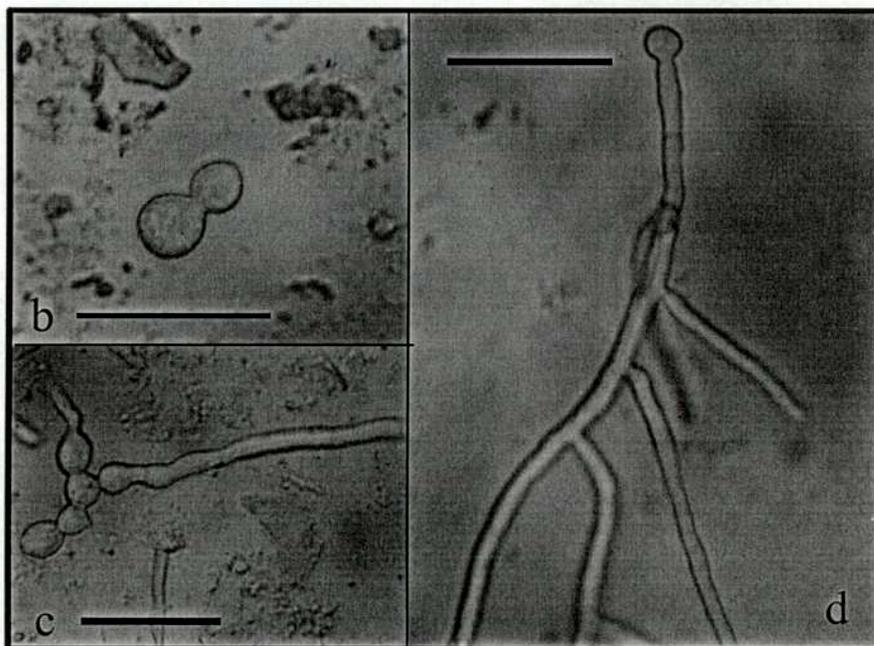
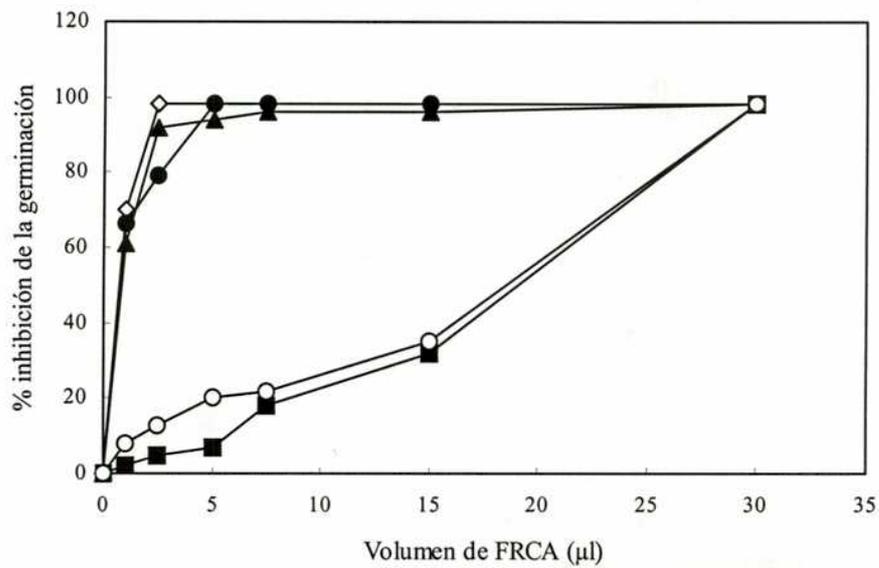


Figura 8. a- Efecto de la FRCA sobre la germinación de ascosporas de *Sclerotinia sclerotiorum* (■) y conidios de *Phoma oleracea* (◇), *Alternaria helianthii* (●), *Verticillium dahliae* (▲) y *Botrytis cinerea* (○). Los resultados son el promedio de 3 repeticiones y el desvío estándar no superó el 10 % en ningún caso. b-c.- Efecto de la FRCA sobre la morfología de tubos germinativos de conidios de *B. cinerea*. d.- Morfología del tubo germinativo de un conidio de *B. cinerea* en ausencia de FRCA (control). Barra: 10 µm

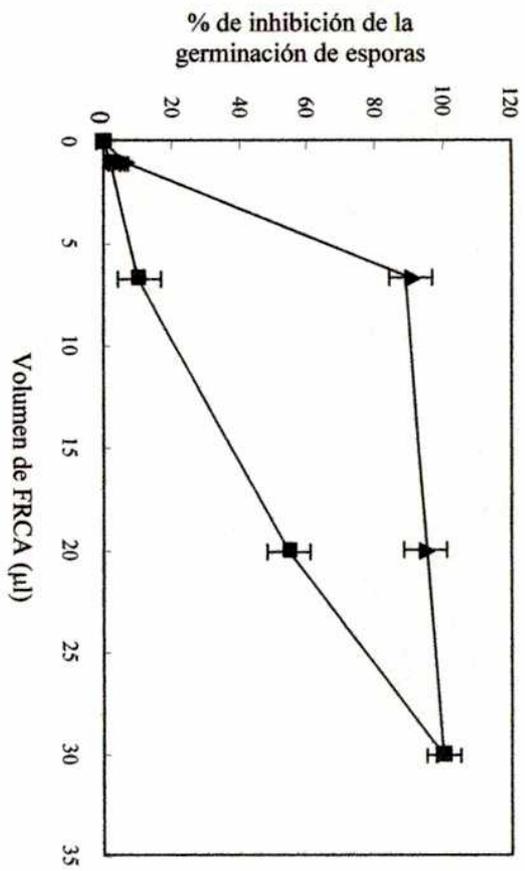
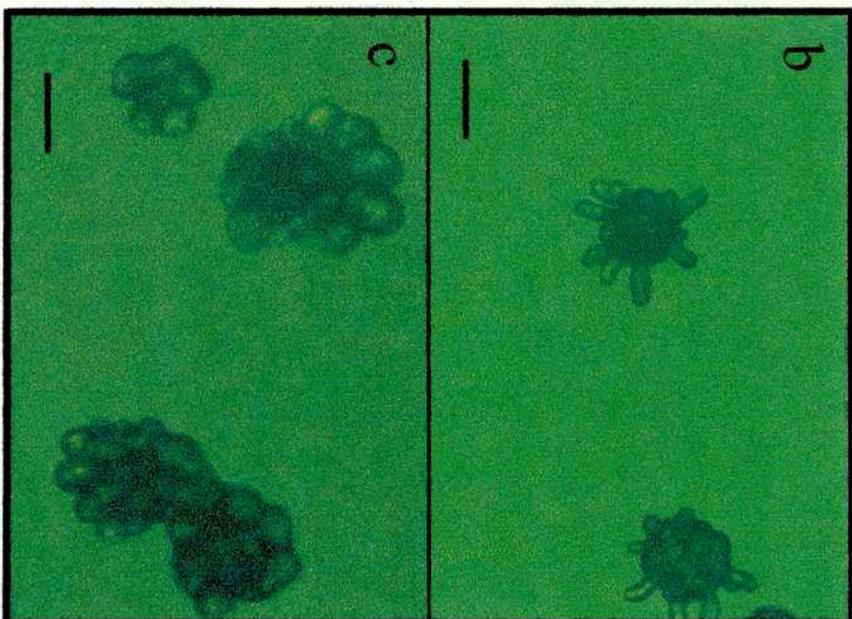


Figura 9. a- Efecto de la FRCA sobre la germinación de conidios de *E. purpurascens* (\blacktriangle) y ascosporas de *S. sclerotiorum* (\blacksquare). Las fotografías muestran la morfología de los tubos germinativos de *E. purpurascens* luego de 16 h de incubación en ausencia (b) o en presencia (c) de la FRCA. Barra = 20µm.



R. 1. 3.- Efecto del pH sobre la retención de los compuestos antifúngicos en columnas de fase reversa.

Cuando el pH del buffer de siembra fue bajo, la actividad biológica de la FRCA fue alta (Fig. 10). A medida que se aumentó el pH del buffer de siembra, la actividad biológica de la FRCA fue cada vez menor, mientras que aumentó notablemente la actividad biológica de la fracción A.

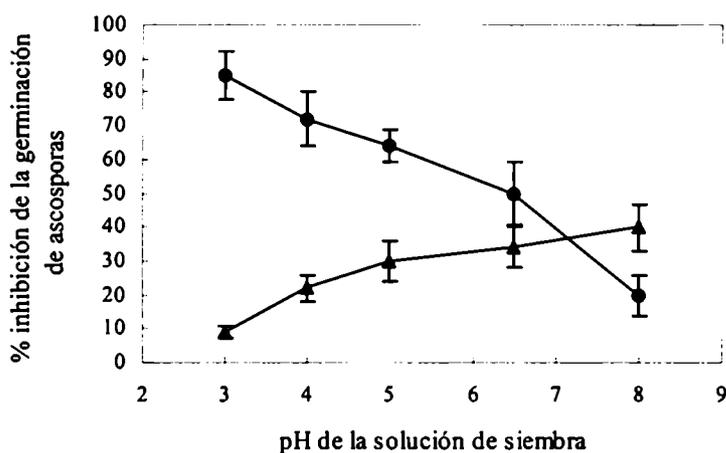


Figura 10.- Efecto del pH sobre la retención de los compuestos antifúngicos en columnas de fase reversa. Alícuotas de un filtrado del medio de crecimiento de *E. purpurascens* se llevaron a distintos pHs y cada una de ellas se sembró en una columna octadecil de fase reversa. La solución de siembra fue recogida a la salida de la columna (fracción A, ▲) y en todos los casos se ajustó su pH a 5. La columna se lavó con agua y los compuestos retenidos en la misma se eluyeron con metanol. La fracción metanólica se secó bajo vacío y se disolvió el residuo en buffer fosfato 25 mM pH 5 (FRCA, ●). Se determinó el efecto de ambas fracciones sobre la germinación de ascosporas. El porcentaje de inhibición de la germinación se calculó mediante la fórmula descrita en la sección MM.6.

R. 1. 4.- Efecto del pH sobre la actividad biológica de la FRCA.

El porcentaje de germinación de ascosporas en ausencia de la FRCA no varió significativamente en el rango de pHs entre 3 y 9, siendo su valor de alrededor del 84 %. De todas maneras, para determinar el efecto del pH sobre la actividad biológica de la FRCA se hizo un control de germinación a cada pH y se calculó el porcentaje de germinación de ascosporas mediante la fórmula descrita en la sección MM.6. La inhibición de la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum* por la FRCA mostró una fuerte dependencia del pH. A todos los pHs evaluados se inhibió la germinación en algún grado, pero los efectos fueron más notables a pH 5, al cual la inhibición llegó al 87 % (Fig. 11).

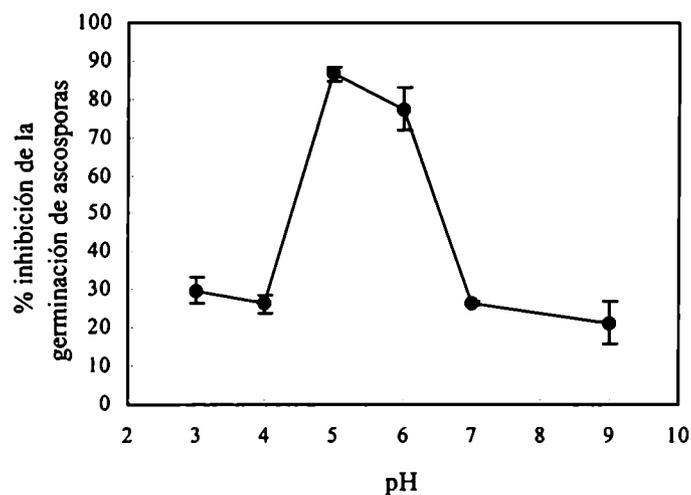


Figura 11.- Efecto del pH sobre la actividad biológica de la FRCA. Alicuotas de la FRCA (pH inicial =5) fueron llevadas a distintos pHs entre 3 y 9. Luego se determinó el efecto de cada una de esas alicuotas sobre la germinación de ascosporas usando como control buffer fosfato 25 mM al pH correspondiente. El porcentaje de inhibición de la germinación causado por la FRCA se calculó mediante la fórmula descrita en la sección MM.6.

R. 1. 5.- Efecto del pH sobre la estabilidad de la FRCA.

La estabilidad de la actividad biológica de la FRCA a lo largo del tiempo dependió fuertemente del pH. Cuando el pH de la FRCA fue ajustado a 7, la misma perdió totalmente su capacidad de inhibir la germinación de ascosporas al cabo de 19 horas (Fig. 12). Por el contrario, a pH 3 la FRCA mantuvo su actividad biológica a lo largo del tiempo, al menos hasta el tiempo máximo de 5 días que duró el ensayo (Fig. 12).

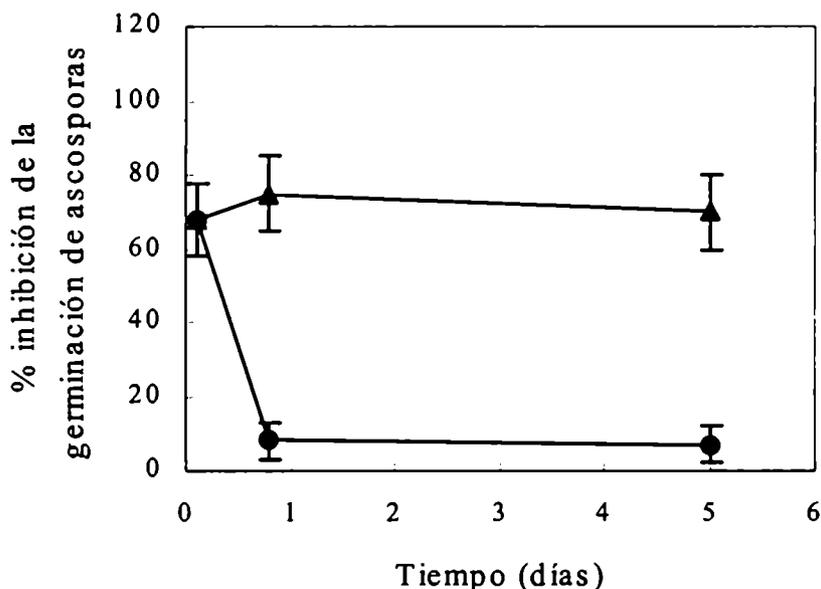


Figura 12.- Efecto del pH sobre la estabilidad de la FRCA. Alicuotas de la FRCA (pH inicial =5) fueron llevadas a pH 3 (—▲—) o bien a pH 7 (—●—) e incubadas a 25 °C durante distintos tiempos, luego de lo cual se ajustó el pH de las mismas a 5 nuevamente. Se determinó el efecto de las distintas alicuotas sobre el porcentaje de germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*, usando buffer fosfato 25 mM pH 5 como control. El porcentaje de inhibición de la germinación fue calculado mediante la fórmula citada en la sección MM.6.

R. 2.- La FRCA como tratamiento preventivo de enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum*.

R. 2. 1.- Efecto de la aplicación de la FRCA sobre el desarrollo de podredumbre de capítulos.

Las plantas usadas como control de enfermedad (Tratamiento 2) fueron las descritas en la sección MM.7.1.1 del capítulo I. En esa misma sección se describió también el progreso de la enfermedad en dicho grupo de plantas a lo largo del tiempo. En términos generales, la aplicación de la FRCA sobre capítulos de plantas cultivadas en invernadero no afectó significativamente la incidencia ni la severidad de la podredumbre húmeda resultante de la inoculación de las mismas con ascosporas de *S. sclerotiorum* (Tabla 8). Sin embargo, en plantas tratadas con la FRCA, la incidencia en brácteas a los 7 días p.i. (59 %) fue levemente menor que en plantas no tratadas con FRCA (88 %). De todas maneras, la significación estadística de esas diferencias fue baja ($P=0,051$). Las plantas tratadas solamente con la FRCA (Tratamiento 5) tuvieron un aspecto normal.

Tabla 8. - Efecto de la aplicación de la fracción rica en compuestos antifúngicos (FRCA) sobre la incidencia y la severidad de la podredumbre de capítulos de plantas de girasol cultivadas en invernadero.

Tratamiento	Ligulas		Brácteas		Receptáculo (14 días p.i.)		Receptáculo (21 días p.i.)	
	I	S	I	S	I	S	I	S
1) FRCA + <i>S. sclerotiorum</i>	100	48	59	31	83	72	95	91
2) 0,1 ml/l Tween 20 + <i>S. sclerotiorum</i>	88	52	88	17	78	63	95	95
Contraste								
Valor de P								
1 vs 2	0,074	1,0	0,051	0,6	0,6	0,7	1,0	1,0

Los tratamientos fueron aplicados cuando 3 a 6 hileras de flores de cada capítulo habían entrado en antesis. Todos los capítulos fueron inoculados con *S. sclerotiorum* 24 h más tarde. La incidencia (I) fue definida como el porcentaje promedio de plantas con síntomas en la parte del capítulo considerada. Los datos fueron analizados usando un modelo lineal generalizado para una respuesta binomial y una función de logaritmo. La severidad (S) fue definida como el porcentaje promedio de tejido dañado en la parte del capítulo considerada (se calculó teniendo en cuenta solamente las plantas con síntomas). Se hizo una transformación angular de los datos y luego se los sometió a un análisis de la varianza. p.i.: post-inoculación.

R. 2. 2.- Efecto de la aplicación de la FRCA sobre el desarrollo de podredumbre de hojas.

En los dos experimentos realizados se detectó podredumbre de las hojas 48 horas después de la inoculación con *S. sclerotiorum*. Todas las hojas inoculadas presentaron síntomas. En el primer experimento, el tamaño de las lesiones fue levemente menor en las plantas tratadas con la FRCA que en las plantas controles (Tabla 9). De todas maneras, tales diferencias no tuvieron significación estadística. En el segundo experimento, no hubo diferencias en el tamaño de la lesión entre los controles y las plantas tratadas con la FRCA (Tabla 9). En ninguno de los dos experimentos se detectaron síntomas de daño en las plantas que fueron tratadas solamente con la FRCA.

Tabla 9.- Efecto de la aplicación de la FRCA sobre el desarrollo de podredumbre de hojas de girasol causada por *S. sclerotiorum*.

	Incidencia		Longitud de la lesión (cm)	
	Control	FRCA	Control	FRCA
Experimento 1	100	100	2,57 ± 0,69	1,83 ± 0,88
Experimento 2	100	100	6,25 ± 1,45	5,53 ± 1,03

Hojas de plantas en estado de botón floral cerrado fueron tratadas con 2 ml de la FRCA o bien con 2 ml de buffer fosfato 25 mM pH 5 (control). Al cabo de 3 horas, las hojas fueron inoculadas ubicando un disco de micelio de *S. sclerotiorum* a 1 cm del ápice. La zona inoculada se cubrió con papel de aluminio durante 6 horas y se determinó el largo de la lesión al cabo de 72 horas. La incidencia fue definida como el número de plantas con síntomas en la hoja inoculada. Los resultados correspondientes a la longitud de la lesión representan promedios ± DS de 4 (experimento 1) y 16 (experimento 2) repeticiones.

DISCUSIÓN

D. 1.- Generalidades.

Los experimentos realizados en este capítulo permitieron demostrar que durante el cultivo *in vitro*, el aislamiento de *Epicoccum purpurascens* utilizado para las experiencias de control biológico produce y libera al medio de crecimiento compuestos capaces de inhibir el crecimiento de micelio y la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*. Resultados semejantes fueron obtenidos por Zhou *et al.* (1991), aunque los experimentos realizados por dichos autores no excluyeron la posibilidad de que ocurrieran fenómenos de competencia por nutrientes. Una vez confirmada la producción de compuestos antifúngicos, se evaluó el potencial de la aplicación de los mismos como tratamiento para el control de enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum*, para lo cual se preparó una fracción rica en compuestos antifúngicos (FRCA) a partir de filtrados de cultivos en medio líquido. En los párrafos siguientes se discute el potencial de la aplicación de dichos compuestos como tratamiento preventivo de enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum* y el posible papel desempeñado por los mismos en los fenómenos de control biológico descritos en el capítulo I. Por otra parte se hicieron experimentos *in vitro* para estudiar el efecto del pH sobre la estabilidad de los compuestos antifúngicos y su actividad biológica, con el objeto de obtener información acerca de las propiedades de dichos compuestos y entender mejor los resultados obtenidos en los ensayos realizados *in planta*. Además, sobre la base de los resultados obtenidos en experimentos realizados *in vitro* se discute también acerca de las posibles funciones de dichos compuestos en la interacción entre *E. purpurascens* y otros hongos en la naturaleza.

D. 2.- El potencial de los compuestos antifúngicos producidos por *E. purpurascens* como tratamiento preventivo de algunas enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum*.

En un experimento hecho en cámaras de cultivo, la aplicación de la FRCA sobre hojas resultó en un control muy leve del daño provocado por una inoculación artificial con discos de micelio de *S. sclerotiorum*. En otro experimento similar, la FRCA no protegió a las hojas de la infección. En forma semejante, en el primer ensayo realizado en invernadero, la aplicación de la FRCA sobre capítulos no proporcionó ninguna protección contra la podredumbre húmeda provocada por la inoculación artificial con ascosporas. De este modo, los compuestos antifúngicos producidos por el aislamiento de *E. purpurascens* usado en este estudio tuvieron un potencial prácticamente nulo como fungicidas para el control de enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum*. La concentración de compuestos antifúngicos presentes en la FRCA no pudo ser determinada, dado que no se hizo una purificación completa y no se identificó a los mismos. De todas maneras, la preparación usada para los experimentos *in planta* inhibió el crecimiento de micelio y la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum in vitro* (secciones R.1.1.1 y R.1.1.2, respectivamente). Diversos factores pueden haber provocado que la dosis de compuestos antifúngicos capaz de inhibir la germinación de ascosporas *in vitro* no hiciera lo mismo *in planta*. Una de ellas es que los compuestos antifúngicos hayan sido degradados cuando se encontraron sobre la superficie de la planta. Por ello se estudió la relación entre el pH y la estabilidad de la actividad biológica de la FRCA, resultando la misma muy estable a pH ácido, mientras que fue poco estable a pH neutro. Tal estudio se realizó porque durante la preparación de la FRCA se obtuvieron indicios de que la estructura (o al menos el estado de ionización) de los compuestos presentes en la FRCA dependían del pH. Tales indicios surgieron de la observación de que la retención de los compuestos antifúngicos en las columnas de fase reversa usadas para preparar la FRCA dependió del pH del buffer de siembra. Esto sugirió que los compuestos antifúngicos poseen algún grupo carboxilo que resultó protonado a pH bajo, disminuyendo así la carga neta de la molécula y por lo tanto su hidrofiliidad, lo cual favorece la adsorción en matrices de interacción hidrofóbica como la de la columna usada. Además, la actividad biológica resultó fuertemente dependiente

del pH. Por esa razón se ajustó el pH de la FRCA al valor óptimo para la actividad biológica *in vitro* (pH 5) antes de usar dicha fracción para los ensayos de control de enfermedades *in planta*. Por lo tanto, al aplicar la FRCA *in planta* se debió adoptar una solución de compromiso, dado que se eligió el pH al cual la actividad biológica es máxima, aunque el mismo probablemente no sea el óptimo para la estabilidad de los compuestos antifúngicos, dado que es un pH intermedio entre los dos usados para evaluar la estabilidad de los compuestos. De este modo, el pH del entorno en que se encontraron los compuestos antifúngicos una vez aplicados sobre la superficie del capítulo puede haber afectado tanto su estabilidad como su actividad biológica. Esto puede haber sido una de las causas de la ausencia de actividad de la FRCA *in planta*. De todos modos, muchos otros factores, tales como radiaciones y degradación por microorganismos pueden haber afectado también la estabilidad de dichos compuestos.

D. 3.- El papel de los compuestos antifúngicos en la interacción entre *E. purpurascens* y *S. sclerotiorum*.

En algunos casos, la importancia de los compuestos antifúngicos en el control biológico de enfermedades ha sido claramente establecida (Gutterson *et al.*, 1986; Howell & Stipanovic, 1983; Tomashow *et al.*, 1986). En el caso particular del control biológico de enfermedades por parte de *E. purpurascens*, se ha postulado que la producción de este tipo de compuestos juega un rol importante (Zhou *et al.*, 1991; Madrigal *et al.*, 1991). Sin embargo, en general resulta difícil obtener pruebas contundentes de la producción de compuestos antifúngicos *in planta* por parte de un ACB y demostrar su participación en el control de la patogénesis por parte de otro organismo. En este sentido, la obtención de mutantes incapaces de producir compuestos antifúngicos sería de gran utilidad. Sin embargo, en el caso de *E. purpurascens* no se han caracterizado enzimas involucradas en la síntesis de compuestos antifúngicos, ni tampoco se han aislado genes que codifiquen para las mismas. Por otra parte, la variedad de compuestos antifúngicos producidos por este hongo es grande (Madrigal *et al.*, 1991). La flavipina (1,2-diformil-4,5,6-trimetoxi-3-metil

benceno) ha sido el mejor caracterizado y su aplicación sobre plantas de duraznero ha resultado en un buen grado de control de la podredumbre morena del fruto causada por *Monilinia laxa* (Madrigal *et al*, 1991). En el presente trabajo se usó la metodología descrita por dichos autores para determinar si el aislamiento usado como ACB producía flavipina, habiéndose obtenido resultados negativos (datos no presentados). Por lo tanto, es probable que la actividad biológica de la FRCA se deba a otros compuestos antifúngicos.

El hecho de que la aplicación de la FRCA no reduzca la incidencia de la podredumbre del capítulo, no necesariamente implica que la producción de compuestos antifúngicos por parte de *E. purpurascens* no sea uno de los mecanismos involucrados en el control biológico de dicha enfermedad. Cabe la posibilidad de que *in planta*, *E. purpurascens* produzca compuestos antifúngicos diferentes a los que produce en el cultivo *in vitro*. Como en cualquier caso en el que se desea obtener pruebas contundentes acerca de la participación de un mecanismo de antibiosis en fenómenos de control biológico, resultaría fundamental contar con mutantes no productoras de los mismos. Por las razones descritas anteriormente, esto no es factible para el caso de antibióticos producidos por *E. purpurascens* al presente. Una alternativa al uso de mutantes sería comparar el potencial de control biológico del aislamiento usado en este estudio con alguno de los aislamientos que no inhibieron el crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* en los ensayos de antagonismo *in vitro*, demostrando previamente que la menor inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum* está asociada con una menor producción de compuestos antifúngicos. De todos modos, como se discutió anteriormente, no se puede garantizar que la producción de compuestos antifúngicos por parte de dos aislamientos sea idéntica *in planta* e *in vitro*. Además, es probable que dichos aislamientos difieran entre sí en otros aspectos, no necesariamente relacionados con la producción de antibióticos, pero sí relacionados con su potencial como agentes de control biológico. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante este tipo de aproximaciones no producirían pruebas definitivas acerca del rol de la antibiosis *in planta*.

Por otra parte, resulta llamativo que la germinación de conidios de *E. purpurascens* haya sido inhibida por la FRCA en forma más notable que la germinación de esporas del resto de los hongos estudiados. Esto sugiere que es

poco probable que dichos compuestos otorguen una ventaja a los conidios de *E. purpurascens* en la competencia con esporas de otros hongos por la colonización de sustratos. Esto es coherente con las evidencias de que los conidios de *E. purpurascens* no produjeron compuestos antifúngicos durante la germinación, tal como se discutió en el capítulo I. En forma contraria a lo observado en relación a la germinación de conidios, el crecimiento de micelio del aislamiento IFCC 48/99 de *E. purpurascens* no fue inhibido por la FRCA en ensayos similares a los realizados con *S. sclerotiorum* en la sección R.1.1.1 (datos no mostrados). En forma semejante, ensayos de co-cultivo de dos colonias de dicho aislamiento de *E. purpurascens* mostraron que no se produjo inhibición a distancia de las mismas (datos no presentados). En conjunto, las distintas evidencias sugieren que los compuestos antifúngicos producidos por *E. purpurascens* podrían otorgar una ventaja al micelio de este hongo en la competencia con micelio (y /o esporas) de otros hongos por la colonización de sustratos. Por el contrario, dichos compuestos no otorgarían ninguna ventaja competitiva a los conidios de *E. purpurascens*.

D. 4.- El espectro y el modo de acción de los compuestos antifúngicos.

La inhibición de la germinación de conidios por parte de la FRCA se extendió a todos los hongos estudiados, lo cual demuestra que los compuestos antifúngicos presentes en la misma poseen un espectro de acción amplio. Tal como se describió en la sección R.1.1.2, la FRCA indujo alteraciones en la morfología de los tubos germinativos de *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* y *E. purpurascens*. En el resto de los hongos sobre los cuales se evaluaron los efectos de la FRCA, no se pudo determinar si ocurren efectos semejantes, debido a la poca cantidad de conidios germinados en presencia de las cantidades de FRCA usadas y al escaso crecimiento de sus tubos germinativos. Efectos semejantes sobre la morfología de hifas de *S. sclerotiorum* próximas a hifas de *E. purpurascens* fueron descritos por otros autores (Zhou et al., 1991). Del mismo modo, *E. purpurascens* alteró la morfología de hifas de *Monilinia laxa* (Madrigal et al., 1991). Dado que estos autores demostraron que la flavipina produce efectos similares, asumieron que la liberación de este compuesto al

medio de crecimiento por parte de *E. purpurascens* es la causa de tales efectos. Sin embargo, tal como se describió antes, en nuestras experiencias no se detectó la presencia de este antibiótico en los filtrados del medio de cultivo de *E. purpurascens*. Cabe la posibilidad de que los efectos observados por nosotros se hayan debido realmente a la presencia de flavipina y no la hayamos detectado por problemas de metodología. Esta posibilidad no se puede descartar porque no se contó con un estándar de flavipina para confirmar que la metodología para la purificación de la misma funcionó adecuadamente en nuestro laboratorio. Otra posibilidad es que los efectos observados se deban a la presencia de otro compuesto antifúngico cuyo modo de acción sea similar al de la flavipina y que por lo tanto provoque efectos semejantes sobre la morfología de hifas de hongos. Serán necesarias futuras experiencias para aclarar este punto.

CONCLUSIONES

- El micelio del aislamiento IFCC 48/99 de *Epicoccum purpurascens*, utilizado en este trabajo de tesis para estudiar el potencial de este microorganismo como agente de control biológico de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, libera al medio de crecimiento compuestos capaces de inhibir el crecimiento de micelio y la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum in vitro*.
- *In vitro*, el espectro de acción de los compuestos antifúngicos producidos por el aislamiento IFCC 48/99 de *E. purpurascens* se extiende a diversos hongos patógenos de girasol.
- La aplicación de tales compuestos no constituye una estrategia apropiada para la protección de hojas y capítulos de plantas de girasol contra la podredumbre causada por *S. sclerotiorum*.
- Tanto la actividad biológica como la estabilidad de los compuestos antifúngicos producidos por el aislamiento IFCC 48/99 de *E. purpurascens*

dependen fuertemente del pH. Este factor, así como otros no considerados en este trabajo de tesis, pueden contribuir a disminuir el potencial de dichos compuestos como herramienta para el control de enfermedades de plantas provocadas por *S. sclerotiorum* y por otros hongos.

- Los compuestos antifúngicos producidos por *E. purpurascens* que se han estudiado en este trabajo de tesis, probablemente otorguen una ventaja al micelio de dicho hongo en la competencia con esporas y micelio de otros hongos por la colonización de sustratos. Por el contrario, tal como se describió en el capítulo I, dichos compuestos no son producidos por *E. purpurascens* durante la germinación de conidios. Además los compuestos antifúngicos no otorgarían una ventaja a los conidios de este hongo, dado que la germinación de los mismos es muy sensible a la inhibición por tales compuestos.

CAPITULO III

El metabolismo de poliaminas en *Sclerotinia sclerotiorum* y su relación con procesos de crecimiento y diferenciación

RESUMEN

Las poliaminas son compuestos policatiónicos esenciales para el crecimiento y el desarrollo de todos los seres vivos. Las más comunes son la diamina putrescina, la triamina espermidina y la tetraamina espermina. Varios procesos de diferenciación que ocurren en hongos son acompañados por cambios en el metabolismo de poliaminas y la inhibición específica de tales cambios bloquea dichos procesos de diferenciación. Los inhibidores específicos de la síntesis de poliaminas han resultado una herramienta muy útil para el estudio del metabolismo de estos compuestos en diversos organismos. Por otra parte, dado que existen diferencias en el metabolismo de poliaminas de hongos y plantas, se ha postulado que la inhibición específica de la síntesis de estos metabolitos en hongos puede resultar en el control de enfermedades de plantas de origen fúngico. En este capítulo se resumen los antecedentes referentes al metabolismo de poliaminas en hongos y su relación con procesos de crecimiento, diferenciación y patogénesis. Hasta el presente no existían antecedentes acerca del rol de las poliaminas en los procesos de crecimiento y diferenciación que ocurren durante el ciclo de vida de *S. sclerotiorum*.

En este trabajo de tesis se estudiaron los efectos de varios inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre el crecimiento, la diferenciación, los niveles de poliaminas y la actividad de algunas de las enzimas responsables de la síntesis de las mismas en *S. sclerotiorum*. La α -difluorometilornitina (DFMO, inhibidor de la ornitina descarboxilasa) y la α -difluorometilarginina (DFMA, inhibidor de la arginina descarboxilasa) redujeron notablemente el crecimiento de micelio. El

efecto de la DFMO se debió a la inhibición de la ornitina descarboxilasa (ODC), lo cual se comprobó en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Por otra parte, no se encontraron evidencias acerca de la existencia de una vía de síntesis de putrescina que involucre a la arginina descarboxilasa (ADC). El efecto de la DFMA se debió en parte a la inhibición de la ODC, presumiblemente después de su conversión en DFMO por la arginasa, tal como lo sugirieron los altos niveles de esta última enzima encontrados tanto en micelio intacto como en extractos libres de células del mismo. Por otra parte, no se puede descartar que la DFMA haya ejercido efectos tóxicos sobre procesos metabólicos ajenos a la síntesis de poliaminas. La ciclohexilamina (CHA, inhibidor de la espermidina sintasa), si bien causó una disminución notable de los niveles de espermidina en micelio, solamente inhibió el crecimiento del mismo en forma muy leve. En forma semejante, la metilglioxal *bis* [guanil hidrazona] (MGBG, inhibidor de la *S*-adenosilmetionina descarboxilasa) no tuvo efecto sobre el crecimiento de micelio. Por otra parte, excepto la MGBG, todos los inhibidores disminuyeron notablemente la formación de esclerocios. Los resultados demuestran que el desarrollo de los mismos es mucho más sensible a la inhibición de la síntesis de poliaminas que el crecimiento de micelio. Además, los resultados sugieren que este último puede ser soportado tanto por la putrescina como por la espermidina, mientras que los niveles de espermidina (o bien la relación entre los niveles de espermidina y putrescina) son críticos para que ocurra la formación de esclerocios. Por otra parte, la germinación de ascosporas fue insensible a todos los inhibidores de la síntesis de poliaminas usados en este estudio, aunque el crecimiento de micelio derivado de las mismas mostró una sensibilidad similar a la del micelio mantenido en cultivo *in vitro* por repiques sucesivos. De este modo, el potencial de la inhibición específica de la síntesis de poliaminas como estrategia para el control de enfermedades de plantas causadas por *S. sclerotiorum* resulta interesante para aquellas enfermedades en las que el micelio es la principal fuente de inóculo de la enfermedad. Por el contrario, para aquellas enfermedades en las que las ascosporas son la fuente de inóculo, el potencial de dicha estrategia probablemente resulte limitado. De todas maneras resulta interesante el potencial de la misma para la inhibición del desarrollo de esclerocios, dado que estas estructuras de resistencia son claves para la supervivencia del hongo en el suelo y para el inicio de epidemias en las que

tanto el micelio como las ascosporas constituyen la fuente de inóculo de la enfermedad.

INTRODUCCION

I. 1.- Metabolismo de poliaminas.

I. 1. 1- Generalidades.

Las poliaminas son compuestos policatiónicos alifáticos que se encuentran cargados positivamente a pH fisiológico. Algunos de ellos, tales como la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y la tetraamina espermina (Spm) son ubicuos en la naturaleza (Fig. 13). La Spd y la Spm, las cuales tienen tres y cuatro cargas netas positivas respectivamente, son moléculas altamente catiónicas si se tiene en cuenta su tamaño pequeño. De este modo, se unen a macromoléculas aniónicas, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN), los fosfolípidos y varias proteínas (Igarashi *et al.*, 1982; Cohen, 1998). A diferencia de los cationes inorgánicos multivalentes como el Mg^{2+} , estas aminas tienen sus cargas distribuidas en toda la molécula, y el espaciado de las mismas les permite interactuar en forma flexible con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (Marton & Morris, 1987). En sentido estricto, solamente la Spd y la Spm son poliaminas, pero por conveniencia, otros compuestos tales como la Put, el 1,3-diaminopropano (DAP) y la Cadaverina (Cad) también son considerados poliaminas (Fig. 13). Además de las poliaminas comunes, hay también otras moléculas consideradas como poliaminas inusuales, presentes en algas eucariotas, líquenes, briofitas y agrobacterias (Hamana & Matsuzaki, 1985a,b; Hamana *et al.*, 1989). Todas las poliaminas se encuentran en tejidos vivos en concentraciones de 0,01 a 1 mM. Las poliaminas no solo se encuentran como bases libres, sino también conjugadas como amidas, unidas covalentemente a macromoléculas o a componentes celulares solubles tales como ácidos orgánicos, formando compuestos acetilados en células animales, o bien cinamoil derivados en células vegetales (Borrel Azlor, 1996).

Aunque se ha avanzado en el entendimiento de los mecanismos de regulación de los niveles intracelulares de poliaminas, todavía no es bien conocido el rol de las mismas en el crecimiento y la diferenciación celular. Una buena parte de las funciones celulares de las poliaminas puede ser explicada por

explicada por sus efectos sobre la estructura del ARN. Las poliaminas modulan la síntesis de proteínas a varios niveles, incluyendo la estimulación de la síntesis de tipos especiales de proteínas, el ensamblado de la subunidad 30S de los ribosomas y la unión de isoleucina a su ARNt específico (Igarashi & Kashiwagi, 2000). También se han reportado efectos de las poliaminas sobre canales iónicos, y se está avanzando en el entendimiento de sus consecuencias sobre el metabolismo celular.

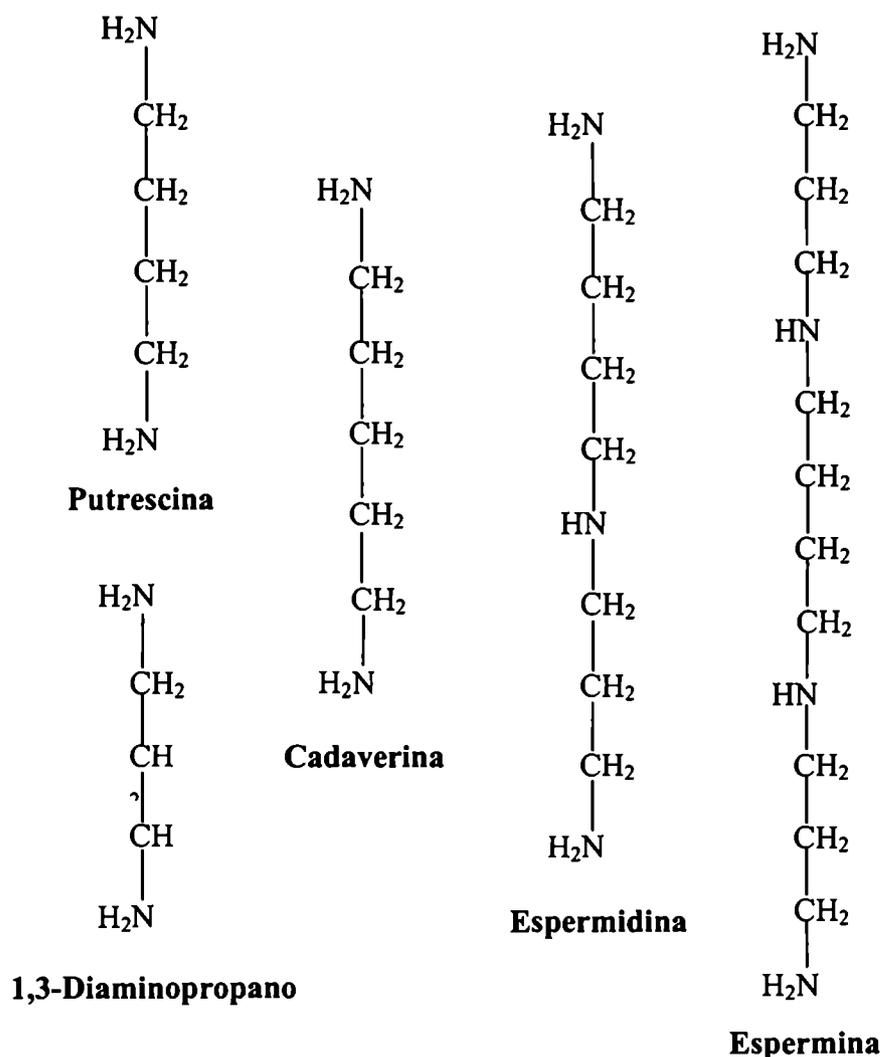


Figura 13.- Estructura de las poliaminas más frecuentemente encontradas en diversos organismos.

I. 1. 2.- Biosíntesis de poliaminas.

El paso inicial de la síntesis de poliaminas es la producción de Put (Fig. 14). Esta reacción es llevada a cabo por la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17), pero en plantas y bacterias, la Put también puede ser sintetizada a partir de arginina por la arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19). En plantas, la ADC convierte la arginina en agmatina (Fig 14), la cual es luego transformada en *N*-carbamoilputrescina (NCP) por la agmatina imino hidrolasa (AIH, EC 3.5.3.12). La NCP es convertida en Put por la NCP amido hidrolasa (NCP AH, EC 3.5.1.53). En hongos, la Put es sintetizada por la vía de la ODC, aunque hay algunas evidencias de la existencia de actividad de ADC en unas pocas especies (Biondi *et al*, 1993, Zarb & Walters, 1994). La Spd y la Spm son sintetizadas a partir de Put por la adición de grupos aminopropilo [NH₂(CH₂)₃-] proporcionados por la *S*-adenosilmetionina (AdoMet) descarboxilada. La síntesis de Ado Met descarboxilada es llevada a cabo por la AdoMet descarboxilasa (AdoMetDC, EC 4.1.1.50), a partir de *S*-adenosilmetionina. La transferencia de un grupo aminopropilo a la Put por la espermidina sintasa (Spd sint, EC 2.5.1.16) resulta en la formación de Spd. En forma semejante, la adición de un grupo aminopropilo a la Spd por la espermina sintasa (Spm sint, EC 2.5.1.22) lleva a la formación de Spm. En plantas, la Cad es sintetizada por la descarboxilación del aminoácido lisina, en una reacción mediada por la lisina descarboxilasa (LDC, EC 4.1.1.18). En células animales y en el hongo *Neurospora crassa*, dicha reacción es catalizada por la ODC (Pegg & McGill, 1979; Paulus *et al.*, 1982).

I. 1. 3.- Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas.

Existe un gran interés en el desarrollo de inhibidores específicos de la síntesis de poliaminas, debido a la utilidad de los mismos como herramienta de estudio de las funciones de las mismas y a su potencial como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de enfermedades de tipo proliferativo y parasitarias (Porter *et al.*, 1992). Los inhibidores han desempeñado un rol fundamental en la elucidación de las vías de síntesis de poliaminas y existe al

menos uno de ellos para cada una de las enzimas involucradas en dichos procesos (Walters, 1995).

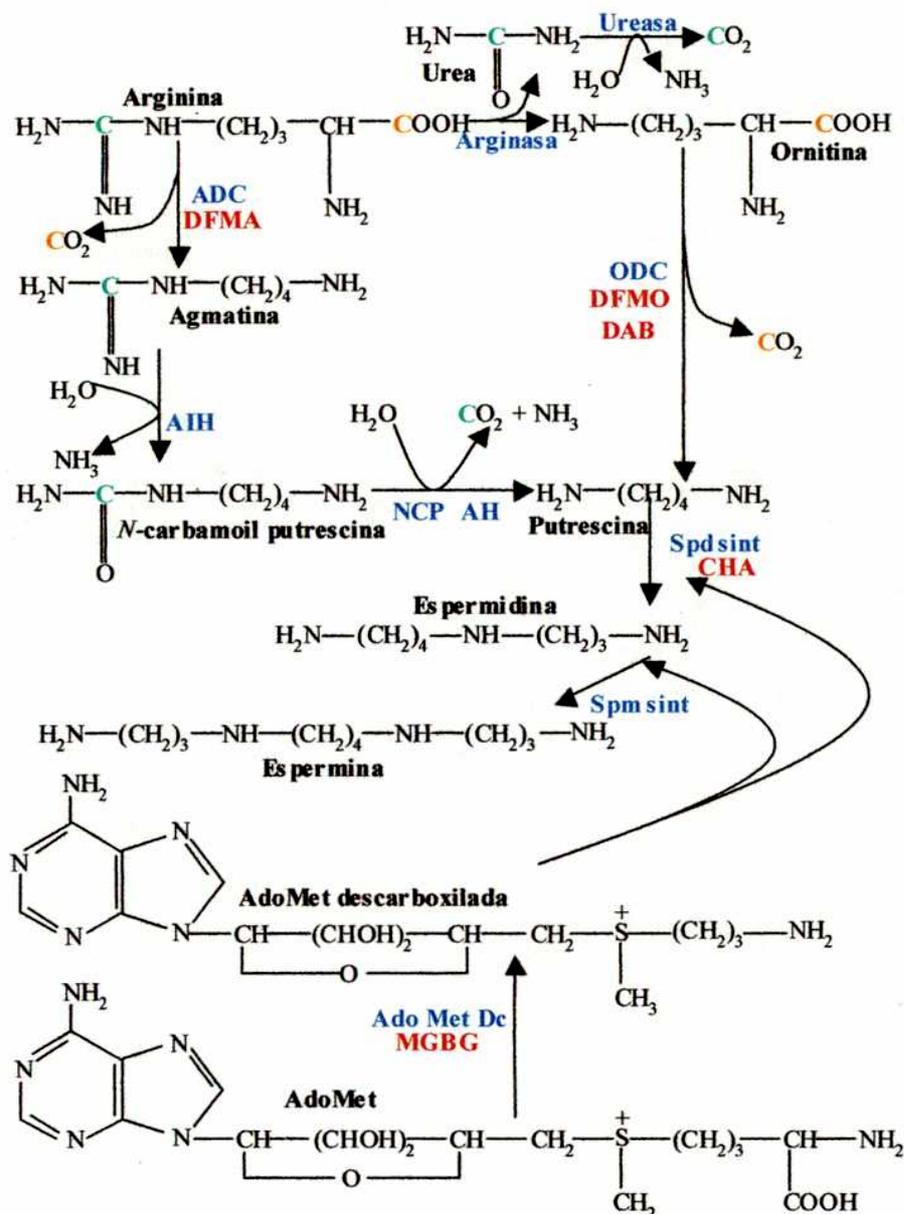


Figura 14.- Biosíntesis de poliaminas y sitios de acción de inhibidores.

Las plantas y algunas bacterias pueden sintetizar putrescina por dos vías alternativas, que involucran a la arginina descarboxilasa (ADC) y la ornitina descarboxilasa (ODC). En mamíferos y en la mayoría de los hongos estudiados hasta el presente, la síntesis de putrescina ocurre solamente por la vía de la ODC. Se señala con diferentes colores a cada uno de los átomos de carbono que se liberan formando parte de moléculas de dióxido de carbono. Las enzimas involucradas se señalan en azul y los inhibidores de las mismas en rojo. AdoMet, S-adenosilmetionina; AdoMet DC, AdoMet descarboxilada; AIH, agmatina imino hidrolasa; CHA, ciclohexilamina; DAB, diamino butanona; DFMA, α -difluorometilarginina; DFMO, α -difluorometilornitina; MGBG, metilglioxal bis[guanil hidrazona]; NCP AH, N-carbamoilputrescina amido hidrolasa; Spd sint, espermidina sintasa; Spm sintasa, espermina sintasa.

I. 1. 3. 1- Inhibidores de la ODC.

Se han desarrollado tres tipos principales de inhibidores de esta enzima. En primer lugar se encuentran los análogos de ornitina y Put que pueden actuar como inhibidores competitivos. Tal es el caso de la metilornitina, la (E)dehidroputrescina y la diaminobutanona (DAB, figs 14 y 15). En segundo lugar, otros inhibidores de tipo competitivo son aquellos capaces de combinarse con el cofactor de la enzima (fosfato de piridoxal), tales como la α -hidrazinoornitina y el 1-aminooxi-4-aminobutano. En tercer lugar se encuentran los inhibidores irreversibles que son activados por la enzima, tales como la α -difluorometilornitina (DFMO, figs 14 y 15) y la dehidromonofluorometilornitina (MFMO). Los inhibidores de tipo competitivo han tenido un uso limitado, debido principalmente a su baja eficiencia y poca selectividad. Los inhibidores activados por la enzima (o suicidas), son pseudo-sustratos químicamente inertes, que tienen en su estructura un grupo que es transformado catalíticamente en una especie reactiva capaz de inactivar a la enzima (Bey *et al.*, 1987). Los inhibidores pertenecientes a este último grupo han sido los más usados.

I. 1. 3. 2- Inhibidores de la ADC.

Dada la similitud de los mecanismos de acción de las descarboxilasas de aminoácidos dependientes de fosfato de piridoxal, las aproximaciones usadas para el diseño de inhibidores de ODC activados por la enzima también han sido exitosas para el diseño de inhibidores de ADC. De este modo, se han sintetizado varios análogos de arginina del tipo α -fluorometil que han demostrado tener alta eficiencia en bacterias. Uno de ellos, la α -difluorometilarginina (DFMA, figs. 14 y 15), ha sido muy usado para estudios de metabolismo de poliaminas en plantas (Cohen, 1998).

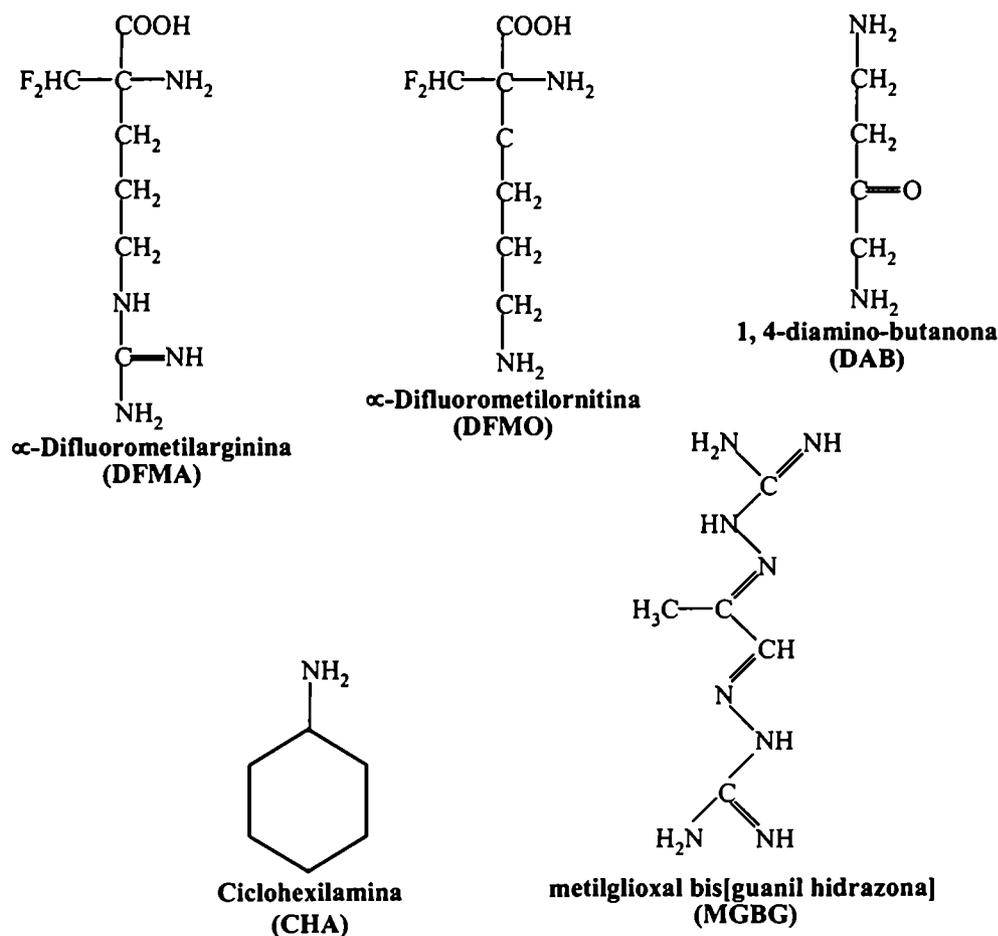
I. 1. 3. 3.- Inhibidores de la AdoMetDC.

Uno de los inhibidores de AdoMetDc más usados es el agente antileucémico metilglioxal bis[guanil hidrazona] (MGBG, figs. 14 y 15), el cual es muy efectivo en células de mamíferos (Pegg & Williams-Ashman, 1987). Estudios cinéticos realizados en dicho sistema demostraron que este inhibidor compite con la AdoMet.

I. 1. 3. 4.- Inhibidores de la Spd Sint.

El inhibidor de Spd Sint más usado es la ciclohexilamina (CHA, figs. 14 y 15), el cual actúa en forma competitiva. Este inhibidor presenta actividad en células de mamíferos y plantas y también en tripanosomas y ciertas bacterias(Cohen, 1998).

Figura 15.- Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas.



I. 1. 4.- Catabolismo de poliaminas.

Los niveles intracelulares de poliaminas están regulados no solo por procesos anabólicos, sino también por procesos catabólicos. Las poliaminas son desaminadas oxidativamente por la acción de aminooxidasas, enzimas de amplia distribución en bacterias, hongos, animales y plantas (Cohen, 1998). En plantas superiores, el catabolismo de poliaminas ocurre por diamino oxidasas que contienen cobre (DAOs; EC 1.4.3.6) y poliamino oxidasas que contienen flavina (PAOs, E.C. 1.5.3.11). La Put es oxidada por la DAO, dando pirrolina. La Spd y la Spm pueden oxidarse formando DAP y pirrolina o 1-(3-aminopropil) pirrolina respectivamente, siendo estas dos últimas reacciones catalizadas por la PAO. En células animales, los grupos aminopropilo de la espermidina y la espermina pueden ser acetilados por la acción de la enzima Spd /Spm N^1 -acetiltransferasa (EC 2.3.1.57). Posteriormente, las PAOs transforman la N^1 acetilespermidina y N^1 acetilespermina a Put y Spd, respectivamente. Estos dos pasos constituyen la vía de interconversión de la degradación de poliaminas (Casero & Pegg, 1993). Durante mucho tiempo se pensó que las plantas no poseían esta vía de interconversión, pero luego se demostró la conversión de Spd a Put en maíz y soja (Caffaro *et al.*, 1993; De Agazio *et al.*, 1995) y también se determinó la presencia de poliaminas acetiladas en la primera de dichas especies (De Agazio *et al.*, 1996).

En hongos, el conocimiento acerca del catabolismo de poliaminas es fragmentario. En general, las poliaminas son clivadas en el grupo amino secundario por una PAO dependiente de flavina, similar a la de células animales (Large, 1992). Sin embargo, existen diferencias entre hongos de distintos grupos taxonómicos en cuanto al sustrato usado por las oxidasas. En la levadura *Candida boidinii*, la degradación de poliaminas ocurre luego de su acetilación (Haywood & Large, 1985). Recientemente se clonó a partir de este hongo el gen que codifica para una enzima capaz de oxidar poliaminas acetiladas, siendo el primer caso reportado en referencia a este tipo de enzima en cualquier organismo (Nishikawa *et al.*, 2000). Por el contrario, la degradación de poliaminas en la levadura *Candida guilliermondii* ocurre sin acetilación previa (Gunasekaran & Gunasekaran, 1999). Por otra parte, en el hongo *Penicillium chrysogenum* se ha reportado la capacidad de degradar poliaminas con

(Kobayashi *et al.*, 1983) o sin (Kobayashi & Horikoshi, 1982) acetilación previa.

I. 2.- El rol de las poliaminas en procesos de crecimiento, diferenciación y patogénesis en hongos.

Existen varios reportes acerca de alteraciones en los niveles de poliaminas asociadas con una variedad de cambios morfológicos en hongos. En las tres secciones siguientes se resumen dichos antecedentes.

I. 2. 1.- El rol de las poliaminas en la transición dimórfica.

Algunas especies de hongos pueden formar hifas o bien pueden vivir como células aisladas, razón por la cual se los conoce como hongos dimórficos. Esta propiedad no está restringida a un grupo taxonómico particular, sino que es compartida por organismos pertenecientes a los Basidiomicetes, Ascomicetes, Zigomicetes y Deuteromicetes. Se han reportado cambios en el metabolismo de poliaminas asociados al proceso de transición dimórfica en especies pertenecientes al Orden Mucorales, así como también en el patógeno de plantas *Ustilago maydis* (Orden Ustilaginales) y las levaduras *Candida albicans* y *Yarrowia lipolytica*.

El hallazgo de la ocurrencia de un incremento de actividad de ODC durante la transición de hifa a micelio en *Mucor racemosus* fue uno de los primeros indicios acerca del rol de las poliaminas en la transición dimórfica de especies del género *Mucor* (Inderlied *et al.*, 1980). Resultados similares, así como también un incremento en los niveles de poliaminas, fueron reportados posteriormente en *Mucor bacilliformis* y *Mucor rouxii* (Calvo-Mendez *et al.*, 1987). Ruiz Herrera *et al.* (1983) confirmaron la importancia de las poliaminas en la transición dimórfica de *M. bacilliformis* al demostrar que mutantes monomórficas incapaces de crecer como micelio poseen una actividad de ODC mucho menor que la de cepas salvajes. Como se discutirá en la sección siguiente, también existen antecedentes acerca de la importancia de las

poliaminas en otros procesos de diferenciación que ocurren en especies del Orden Mucorales. En las levaduras *C. albicans* y *Y. lipolytica*, así como también en el hemibasidiomicete *U. maydis*, la transición dimórfica está íntimamente relacionada con la patogénesis. Por lo tanto, el rol de las poliaminas en la transición dimórfica de estos hongos se discute en la sección I.1.3, dedicada al rol de las poliaminas en dicho proceso.

I. 2. 2.- El rol de las poliaminas en otros procesos de diferenciación.

Usualmente, los niveles de poliaminas aumentan cuando los procesos morfogénicos son acompañados por una alta tasa de división celular, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Este fenómeno ha sido observado en relación con la germinación de zoosporas del quitridiomicete *Blastocladiella emersonii* (Menucci *et al.*, 1975), el oomicete *Achlya ambisexualis* (Wright *et al.*, 1982) y ascosporas de levaduras (Brawley & Ferro, 1979). En cambio, existen procesos de diferenciación que no son acompañados por una rápida proliferación celular, tales como el desarrollo del cuerpo fructífero del mixomicete *Physarum polycephalum*. En este caso, los niveles de poliaminas disminuyen, en forma paralela a la tasa de síntesis de ARN y proteínas (Mitchell & Rusch, 1973). Shapira *et al.* (1989) estudiaron el metabolismo de poliaminas durante el crecimiento y la diferenciación de *Sclerotium rolfsii*, determinando que durante el crecimiento de micelio la actividad de ODC es alta y la Put es la poliamina más abundante. Cuando el crecimiento se detiene como consecuencia del agotamiento de la fuente de carbono, se produce una disminución de la actividad de ODC. Luego, cuando se desarrollan esclerocios, los niveles de Put y Spd descienden drásticamente y los de Spm aumentan. Estos cambios en los niveles de cada poliamina se revirtieron durante la germinación de los esclerocios. De este modo, tanto el crecimiento de micelio como la germinación de esclerocios estuvieron positivamente correlacionados con altos niveles y tasas de síntesis de Put y ausencia de Spm, mientras que la formación de esclerocios se correlacionó con un aumento del contenido de la tetraamina.

I. 2. 3.- El rol de las poliaminas en la patogénesis.

U. maydis es un hongo hemibasidiomicete causante del carbón del maíz. El mismo tiene un ciclo de vida complejo, con dos fases alternantes. La primera de ellas está caracterizada por el crecimiento saprofitico en forma de levaduras haploides. La segunda está caracterizada por el crecimiento en forma de micelio dicariótico, el cual invade la planta hospedante (Bannuet, 1992). Guevara-Olvera *et al.* (1997) clonaron el gen de ODC de este hongo y obtuvieron mutantes nulas que son auxótrofas para poliaminas. Mediante el cultivo en medios suplementados con bajas concentraciones de Put, los autores determinaron que las mutantes pueden crecer en forma de levaduras, pero no pueden hacer la transición dimórfica. De este modo, demostraron que la actividad de ODC es esencial para que ocurra este proceso de diferenciación, el cual es a su vez indispensable para que el hongo pueda infectar a su hospedante.

C. albicans es un patógeno oportunista capaz de producir infecciones sistémicas en humanos y varias especies de animales (Odds, 1988). Sus hifas pueden adherirse e invadir los tejidos del hospedante en forma más eficiente que las levaduras. De este modo, la transición dimórfica parece ser un paso clave para la virulencia de este organismo. La inhibición de la transición dimórfica por la DAB fue la primera evidencia de la importancia de las poliaminas en este proceso (Martinez *et al.*, 1990). Posteriormente se demostró que la emisión del tubo germinativo es acompañada por un aumento transitorio de la actividad de ODC. Dicho aumento de actividad no se correlacionó con un aumento similar de los niveles de ARNm, sugiriendo que la actividad de ODC está regulada en forma post-transcripcional (López *et al.*, 1997). Los mismos autores obtuvieron mutantes nulas de ODC de *C. albicans* y comprobaron que las mismas pueden crecer como levaduras en presencia de bajas concentraciones de poliaminas, en forma semejante a lo descrito anteriormente para las mutantes nulas de ODC de *U. maydis*. Al igual que en *U. maydis*, las mutantes resultaron incapaces de llevar a cabo la transición dimórfica. Sin embargo, las mismas no mostraron una reducción de la virulencia en ratones (Herrero *et al.*, 1999). Probablemente estas mutantes conservan el fenotipo virulento debido a que acumulan poliaminas en la etapa previa a la infección, o bien porque pueden tomarlas de los tejidos del hospedante.

En forma similar a lo descrito para *C. albicans*, Guevara-Olvera *et al.* (1993) demostraron que la transición de levadura a micelio está asociada con un aumento transitorio de los niveles de poliaminas y de la actividad de ODC en *Y. lipolytica*. Además, inhibidores de la ODC bloquearon la transición, demostrando que las poliaminas desempeñan un rol fundamental en dicho proceso.

Bailey *et al.* (2000) obtuvieron mutantes nulas de ODC de *Stagonospora (Septoria) nodorum*, las cuales resultaron auxótrofas para putrescina. Cuando las mutantes se cultivaron en medio suplementado con Put, las mismas esporularon en forma normal. Mediante la inoculación de plantas de trigo con dichas esporas, se comprobó que la virulencia de la cepa mutante estaba severamente disminuida. De este modo, se demostró que este hongo no puede tomar suficientes poliaminas del tejido hospedante durante la infección.

I. 3.- Potencial de inhibidores de la síntesis de poliaminas como funguicidas.

Si bien existe bastante información acerca del metabolismo de poliaminas en levaduras y en *Neurospora crassa*, los estudios realizados en hongos fitopatógenos han sido limitados (Walters, 1995). Esta situación está cambiando, debido en parte a que se demostró que la inhibición específica de la síntesis de poliaminas puede resultar en el control de enfermedades causadas por dichos hongos (Walters & Mackintosh, 1997). Dado que la mayoría de los hongos parecen sintetizar poliaminas exclusivamente por la vía de la ODC, se sugirió que la inhibición de esta enzima podría ser efectiva en el control de patógenos fúngicos sin afectar a las plantas, dado que estas últimas también pueden sintetizar Put por la vía de la ADC (Rajam & Galston, 1985). Además, las ODCs de plantas son menos sensibles que las de otros organismos a la inhibición por DFMO (Walters & Mackintosh, 1997). De este modo, la DFMO redujo el crecimiento *in vitro* de un número importante de hongos fitopatógenos, aunque no todos son igualmente sensibles (Walters, 1995). Además se ha evaluado el potencial de la DFMO para el control de patógenos fúngicos en varios hospedantes. De este modo, la aplicación de DFMO 0,5 mM impidió la infección de plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) por *Uromyces phaseoli*

(Rajam *et al.*, 1985). Del mismo modo, la aplicación de DFMO 0,4 mM redujo en un 97 % la infección de hojas de haba (*Vicia faba*) por *Uromyces vicia-fabae* (Walters, 1986). La DFMO también resultó efectiva para controlar la infección de plántulas de cebada (*Hordeum vulgare*) por *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (West & Walters, 1988). Más aun, la DFMO posee actividad sistémica, habiéndose demostrado que su aplicación en raíces de plántulas de cebada protege a otros órganos de las mismas contra la infección por el patógeno citado anteriormente (Walters & Kingham, 1990). Es interesante notar que en todos los casos anteriores, si bien la DFMO controló las infecciones fúngicas, no ejerció efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas.

Teniendo en cuenta los antecedentes existentes en relación al uso de la DFMO como fungicida, el potencial de otros inhibidores, tales como la MGBG (inhibidor de AdoMetDC, fig. 15) y la CHA (inhibidor de Spd sintasa, fig. 15) ha sido poco explorado. De todas maneras, se ha demostrado que la MGBG reduce el crecimiento *in vitro* de varios hongos fitopatógenos de gran importancia (West & Walters, 1989). Además, se comprobó que tanto la MGBG como la CHA reducen la infección de plántulas de cebada por *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (West & Walters, 1988) y la MGBG también fue efectiva en la protección de plantas de trigo contra la roya negra del tallo provocada por *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Walters, 1995).

OBJETIVOS

- Determinar cuales son las poliaminas más abundantes en el hongo *S. sclerotiorum*.
- Determinar su importancia en algunos de los procesos de crecimiento y diferenciación que ocurren durante el ciclo de vida del mismo (crecimiento de micelio, desarrollo de esclerocios y germinación de ascosporas), los cuales revisten especial importancia en la patogénesis.
- Determinar cual es la vía predominante para la síntesis de putrescina en este hongo.

MATERIALES Y METODOS

MM. 1.- Determinación del efecto de los inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre el crecimiento de micelio y el desarrollo de esclerocios de *S. sclerotiorum*.

Placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo medio Czapek-Dox con distintos inhibidores (1 mM) fueron inoculadas en el centro con discos de micelio (5 mm de diámetro) obtenidos a partir del borde de una colonia de dos días de edad. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 24 °C y los diámetros de las colonias fueron determinados 48 horas después de la inoculación. Al cabo de tres semanas se determinó el número de esclerocios presentes en cada placa. Para la reversión de las inhibiciones, se incluyeron poliaminas (1 mM) en placas que contenían los inhibidores. En experimentos semejantes se evaluó también el efecto de distintas concentraciones de DFMO (0; 0,01; 0,1 0,5 y 1 mM).

MM. 2.- Determinación del efecto de los inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre la germinación de ascosporas y el crecimiento de micelio derivado de las mismas.

Alícuotas de una suspensión de ascosporas en caldo Czapek-Dox fueron colocadas en placas de ELISA de 96 pocillos (Falcon 3912), a razón de 3×10^3 esporas por pocillo. Se agregaron alícuotas de los inhibidores disueltos en agua destilada estéril y el volumen de cada pocillo se ajustó a 40 μ l. La concentración final de los inhibidores fue de 1 mM. El porcentaje de germinación de las ascosporas se determinó después de 16 horas de incubación a 24 °C en oscuridad, en la forma descrita en la sección MM.2.3 del capítulo I. El crecimiento de micelio derivado de la germinación de ascosporas se estimó 48 horas después de la inoculación. Para ello, se determinó la absorbancia a 490 nm de cada pocillo (Raposo *et al.*, 1995), usando un lector de placas de ELISA (BioRad 550).

MM. 3.- Determinación del efecto de los inhibidores sobre los niveles de poliaminas libres en micelio.

Placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo medio Czapek-Dox sólido e inhibidores (1 mM) fueron cubiertas con discos de papel celofán estéril, de forma tal que el mismo cubrió toda la superficie del medio de cultivo. Las placas fueron inoculadas e incubadas tal como se describió en la sección MM.1. Al cabo de 48 horas, se retiró el papel celofán y se separó el micelio adherido al mismo con ayuda de una espátula. El micelio fue lavado dos veces con agua destilada y luego se extrajeron las poliaminas libres. Para ello, muestras de micelio de aproximadamente 20 mg fueron homogeneizadas en 200 μ l de ácido perclórico (PCA) al 5 % e incubadas a 4 °C durante 24 horas. Los extractos se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos y se conservó el sobrenadante. Se agregaron 5 μ l de 1,7-diamino heptano como estándar interno, 100 μ l de Na₂CO₃ saturado y 200 μ l de cloruro de dansilo (5 mg/ml en acetona). Las muestras fueron incubadas en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas y la reacción se detuvo agregando 50 μ l de prolina (100 mg/ml) e incubando en oscuridad durante media hora más, luego de lo cual las poliaminas dansiladas se extrajeron con 250 μ l de tolueno. Se separó la fase orgánica y se evaporó a sequedad bajo vacío. Soluciones patrón de poliaminas fueron tratadas de la misma manera que las muestras de micelio. Las poliaminas dansiladas fueron disueltas en 100 μ l de acetonitrilo y analizadas por HPLC (Marcé *et al.*, 1995), inyectando 10 μ l de cada muestra. Se usó un cromatógrafo compuesto por una bomba ISCO 2350 y un programador de gradientes ISCO 2360, al cual se acopló una columna de fase reversa Pharmacia Sephasil Peptide (Octadecyl, tamaño de partícula de 5 μ m, dimensiones 4,6 x 250 mm). Se usó un detector de fluorescencia Varian 430020-02, con longitudes de onda de excitación y detección de 415 y 510 nm respectivamente. La cuantificación de las áreas de los picos se realizó con un integrador Spectra Physics SP4290. La separación cromatográfica se realizó con un flujo de 1,5 ml/min, usando el siguiente gradiente de solventes:

Etapla 1.- 0 a 4,5 min: 70 % de acetonitrilo: 30 % de agua

Etapla 2.- 4,5 a 9 min: 100 % acetonitrilo

Etapla 3.- 9 a 15 min: 70 % acetonitrilo: 30 % agua

MM. 4.- Determinación de actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas.

Las actividades de ODC, ADC, arginasa y ureasa fueron determinadas tanto *in vivo* como *in vitro*. En todos los casos se cuantificó la cantidad de CO₂ radioactivo producido a partir de los correspondientes sustratos, como se describe a continuación. Para las determinaciones *in vivo* se usaron placas 'multiwell' de 24 pocillos (Falcon 3847) conteniendo 500 µl de caldo Czapek-Dox en cada pocillo. Estos últimos se inocularon con discos de micelio de 2 mm de diámetro y las placas se incubaron a 24 °C en oscuridad durante 48 a 72 horas. Transcurrido ese tiempo se retiró transitoriamente el micelio de cada pocillo para determinar su peso. Luego se colocó nuevamente el micelio en los pocillos correspondientes, se agregó el sustrato radioactivo de cada enzima (0,1 µCi por pocillo) y se cubrió cada pocillo con un disco de papel de filtro embebido en KOH 2 N. Las placas fueron tapadas y selladas con Parafilm®. Al cabo de 20 minutos de incubación en las condiciones antedichas, se retiraron los papeles y se determinó la cantidad de CO₂ radioactivo retenido en los mismos. Para ello, se embebieron los papeles en 200 µl de solución de centelleo para muestras no-acuosas y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo Beckman LS 5000 TD. Por otra parte, cuando fue necesario se tomaron muestras (10 µl) del medio de incubación al inicio y al final de la reacción, y se determinó la radioactividad en las mismas. De ese modo, se estimó la cantidad de sustrato incorporado por el micelio durante la reacción.

La determinación de actividades enzimáticas *in vitro* se realizó en extractos de micelio del hongo preparados a partir de cultivos del mismo en medio líquido. Para ello, se hicieron cultivos de micelio en erlenmeyers conteniendo Czapek-Dox, a 24 °C con agitación (50 rpm). Al cabo de 5 días se cosechó el micelio por centrifugación (4,000 g, 20 min) y se lavó con buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,5. El micelio lavado (10 gramos) se molió en un

mortero con nitrógeno líquido y el polvo obtenido se mezcló con buffer de extracción (50 ml) con la siguiente composición: fosfato de potasio 50 mM pH 7,5; EDTA Na 5 mM; fosfato de piridoxal 0,1 mM; β -mercaptoetanol 20 mM y PMSF 1 mM. La mezcla se homogeneizó en el mortero a 4 °C y luego se centrifugó a 10.000 g durante 25 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se usó como preparación enzimática. Para las determinaciones de actividad se mezclaron 200 μ l de extracto (alrededor de 120 μ g de proteína) con 25 μ l de una solución de sustrato en agua destilada y 25 μ l de buffer de extracción en tubos de vidrio (14 x 880 mm). La concentración de sustrato no radioactivo en la mezcla de reacción fue de 10 mM, y la cantidad de sustrato radioactivo en cada tubo fue de 0,1 μ Ci. Los tubos fueron sellados con tapones de goma atravesados por una aguja, la cual portaba un disco de papel de filtro embebido en KOH 2N (Fig. 16). Los tubos fueron incubados a 32 °C durante 2 horas y la reacción fue detenida agregando 200 μ l de PCA 5 % a través de la aguja incorporada al tapón. Los tubos se incubaron durante 2 horas a 37 °C para favorecer la liberación del CO₂ producido, luego de lo cual la cantidad de CO₂ radioactivo retenido en los discos de papel fue determinada en forma semejante a lo descrito para las mediciones de actividades enzimáticas *in vivo*. Tubos con extracto a los que se les agregó PCA 5 % inmediatamente antes de la incubación a 32 °C fueron usados como blancos de reacción. Los sustratos radioactivos usados para las determinaciones de actividad de cada enzima se detallan en la tabla 10. Para las determinaciones de actividad de arginasa *in vitro* también se evaluó el efecto del agregado de urea, ornitina y agmatina no radioactivas, en todos los casos en una concentración final de 10 mM. La concentración de proteínas en los extractos fue determinada por el método de Bradford (1976), usando albúmina bovina como estándar.

Tabla 10.- Sustratos usados para la determinación de actividad de enzimas de la biosíntesis de poliaminas

Enzima	Sustrato radioactivo	Fuente
ODC	L-[1- ¹⁴ C]ornitina	NEN Life Sciences Products Inc.
ADC	L-[1- ¹⁴ C]arginina	American Radiolabeled Chemicals Inc.
Arginasa	L-[guando- ¹⁴ C]arginina	American Radiolabeled Chemicals Inc.
Ureasa	[¹⁴ C]urea	Amersham Pharmacia Biotech.

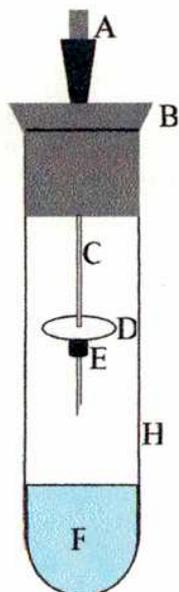


Figura 16.- Esquema del dispositivo usado para determinar la cantidad de ¹⁴CO₂ liberado en extractos libres de células de micelio incubados con sustratos radioactivos. A y B, tapones de goma; C, aguja; D, disco de papel de filtro embebido en KOH 2N; E, tope de goma; F, medio de reacción; H, tubo de vidrio de 14 x 880 mm.

MM. 5.- Incorporación de precursores de la biosíntesis de poliaminas por el micelio de *S. sclerotiorum*.

Placas 'multiwell' de 24 pocillos (Falcon 3847) fueron inoculadas con discos de micelio tal como se describió en la sección anterior. Las mismas se incubaron a 24 °C durante 48 horas. Al cabo de ese tiempo se agregó L-[1-¹⁴C]ornitina o L-[U-¹⁴C]arginina (0,1 µCi por pocillo) y se colocó una 'trampa' para CO₂ consistente en un disco de papel de filtro embebido en 2N KOH. A intervalos de una hora se reemplazaron las 'trampas' por otras y además se tomaron muestras de 10 µl del sobrenadante del medio de incubación. La cantidad de arginina u ornitina radioactiva remanente en dichas fracciones se

determinó luego de mezclarlas con 1 ml de solución de centelleo para muestras acuosas. La cantidad de CO₂ radioactivo presente en las trampas se determinó tal como se describió en la sección anterior.

MM. 6.- Determinación del efecto de la DFMO sobre la incorporación de ornitina por el micelio de *S. sclerotiorum*.

La metodología usada fue similar a la descrita en la sección anterior. Se agregaron distintas concentraciones de DFMO a diferentes pocillos y se determinó su efecto sobre la incorporación de L-[1-¹⁴C]ornitina. El aminoácido radioactivo fue agregado 4,5 horas después del inhibidor.

MM. 7.- Determinación del efecto de los inhibidores sobre la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas.

Se determinó el efecto de la DFMO y la DFMA (ambos en una concentración final de 1 mM) sobre la actividad de ODC *in vitro* e *in vivo*, de acuerdo a la metodología descrita en la sección MM.4. En los experimentos *in vitro* también se determinó el efecto del agregado de urea, a una concentración final de 10 mM.

Todos los experimentos correspondientes a este capítulo fueron realizados al menos dos veces y se hicieron de tres a cinco repeticiones para cada tratamiento

RESULTADOS

R. 1.- Efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre procesos de crecimiento y diferenciación que ocurren durante el ciclo de vida de *S. sclerotiorum*.

R. 1. 1.- Efecto de inhibidores sobre el crecimiento de micelio.

La DFMO y la DFMA (1 mM) redujeron el crecimiento de micelio en un 88 y un 79 % respectivamente (Fig. 17). La CHA (1 mM) redujo el crecimiento

de micelio en un 20 % y la MGBG no tuvo efecto (Fig. 17). Concentraciones mayores de CHA y MGBG (5 mM) redujeron el crecimiento de micelio en un 70 y un 62 % respectivamente (datos no presentados). La inhibición causada por la DFMO fue revertida totalmente por el agregado de Put 1 mM. La inhibición causada por la DFMA fue parcialmente revertida por el agregado de Put 1 mM y no fue afectada por el agregado de agmatina en igual concentración. El efecto inhibitorio de la CHA fue revertido totalmente por el agregado de Spd 1 mM (Fig. 17). Ninguna poliamina modificó el crecimiento de micelio cuando se agregaron las mismas a placas que no contenían inhibidores (datos no presentados).

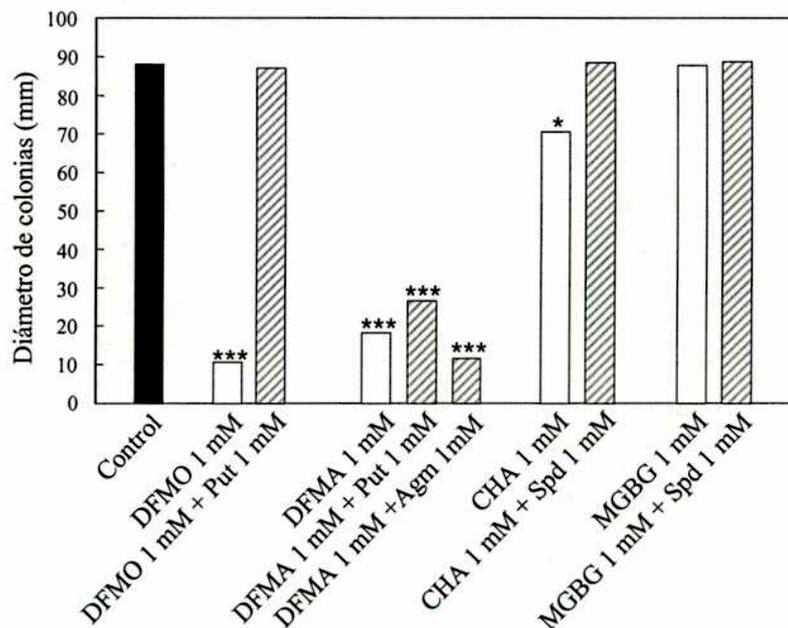


Figura 17.- Efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre el crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum*.

Discos de micelio fueron ubicados en el centro de placas de Petri conteniendo medio de cultivo con inhibidores o bien inhibidores y poliaminas. Después de 72 h de incubación a 24 °C, se determinó el diámetro de las colonias. Los resultados son el promedio de 3 a 5 repeticiones \pm DS. Diferencias significativas entre el control (sin inhibidores) y los tratamientos se muestran como: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

R. 1. 2.- Efecto de inhibidores sobre el desarrollo de esclerocios.

El desarrollo de esclerocios fue completamente inhibido por el agregado de DFMO o DFMA 1 mM (Fig. 18). La CHA redujo la formación de esclerocios en un 98 %, mientras que la MGBG no tuvo efecto (Fig. 18). El

agregado de Put revirtió parcialmente la inhibición causada por la DFMO. Tanto la Put como la agmatina revirtieron muy levemente la inhibición causada por la DFMA. La Spd revirtió completamente la inhibición causada por la CHA (Fig. 18). El agregado de poliaminas a placas sin inhibidores no modificó la cantidad de esclerocios formados (datos no presentados).

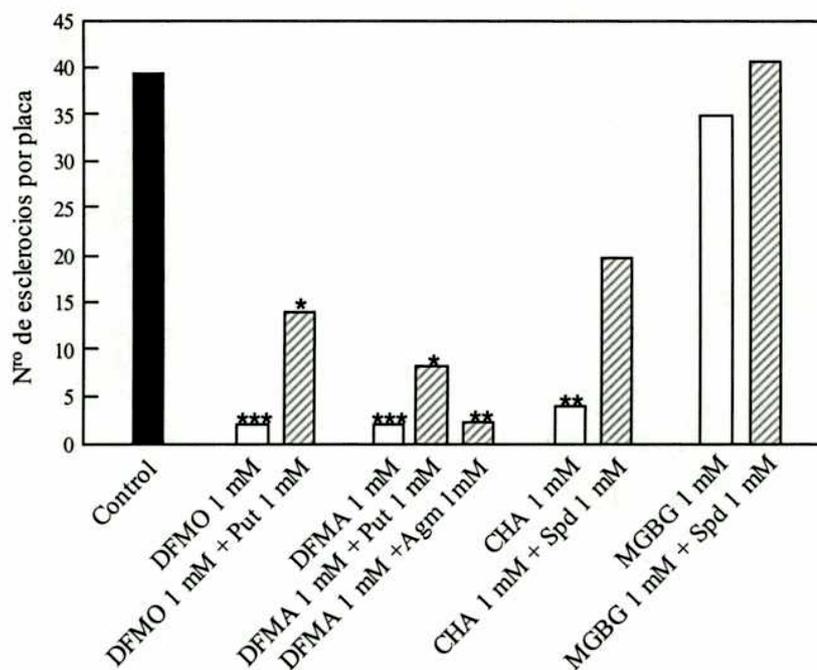


Figura 18.- Efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre la formación de esclerocios de *S. sclerotiorum*. Discos de micelio fueron ubicados en el centro de placas de Petri conteniendo medio de cultivo con inhibidores o bien inhibidores y poliaminas. Después de 14 días de incubación a 24 °C, se determinó el número de esclerocios por placa. Los resultados son el promedio de 3 a 5 repeticiones \pm DS. Diferencias significativas entre el control (sin inhibidores) y los tratamientos se muestran como: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

En experimentos semejantes realizados con distintas concentraciones de DFMO, la formación de esclerocios se vio disminuida en presencia de 0,01 mM del inhibidor, mientras que el crecimiento de micelio no se vió afectado en dichas condiciones (Fig.19). Para a todas las concentraciones de inhibidor evaluadas, el desarrollo de esclerocios fue más sensible que el crecimiento de micelio.

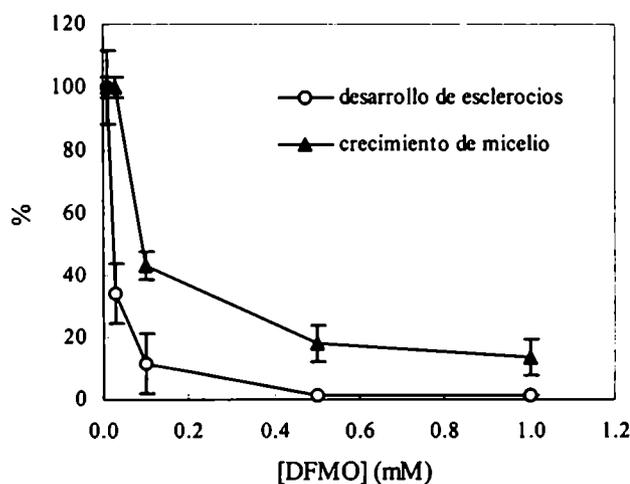


Figura 19.- Efecto de la DFMO sobre el crecimiento de micelio y el desarrollo de esclerocios de *S. sclerotiorum*. El hongo fue cultivado en medio sólido suplementado con diferentes concentraciones de DFMO y se determinó el diámetro de las colonias y el número de esclerocios al cabo de 3 y 14 días respectivamente. Los resultados son el promedio de 3 a 5 repeticiones \pm DS y se expresan como porcentajes de los valores correspondientes a los controles sin inhibidor.

R. 1. 3.- Efecto de inhibidores sobre la germinación de ascosporas y el crecimiento de micelio derivado de las mismas.

La germinación de ascosporas, evaluada 16 horas después del inicio del ensayo, no fue afectada por ninguno de los inhibidores (Fig. 20). A los 4 días de iniciada la experiencia, se evaluó el crecimiento de micelio derivado de la germinación de ascosporas sobre la base de la absorbancia a 490 nm, de acuerdo lo descrito en MM.2. En este caso resultó evidente su inhibición por la DFMO y la DFMA, en forma semejante a lo observado en los ensayos realizados en placas de Petri (sección R.1.1). La CHA, por el contrario, no afectó el crecimiento del micelio derivado de ascosporas, al menos en el tiempo que duró el ensayo (48 horas).

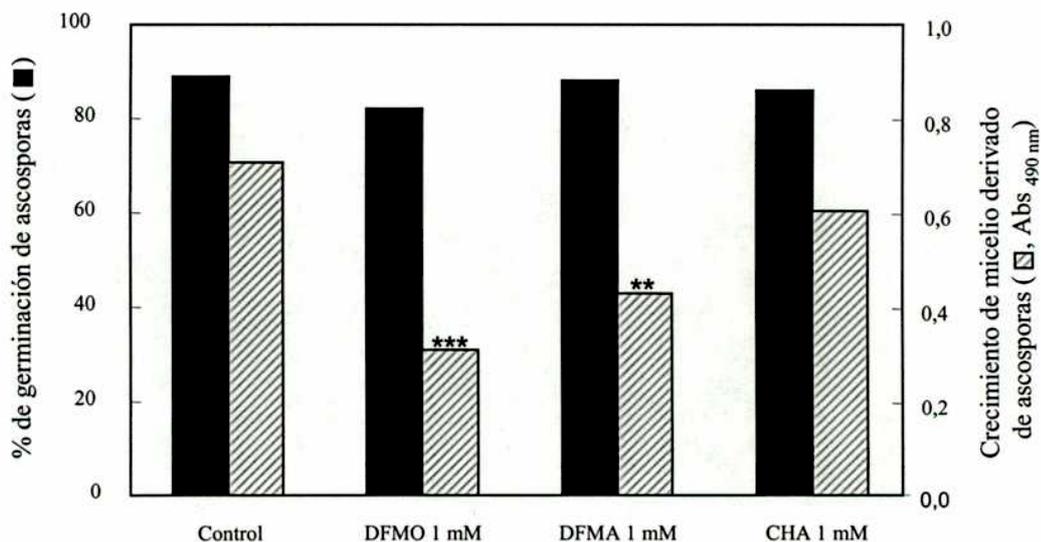


Figura 20.- Efecto de los inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre la germinación de ascosporas y el crecimiento de micelio derivado de las mismas. Se colocaron ascosporas en placas 'multiwell' de 96 pocillos (3.000 ascosporas /pocillo) conteniendo caldo Czapek-Dox suplementado con inhibidores, en un volumen total de 40 μ l /well. Después de 16 h de incubación a 24 °C se determinó el porcentaje de germinación por observación al microscopio. A los 4 días se estimó el crecimiento de micelio derivado de ascosporas en base a la absorbancia a 490 nm, usando un lector de ELISA. Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS. Diferencias significativas entre el control (sin inhibidores) y los tratamientos se muestran como: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

R. 1. 4.- Efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre los niveles de las mismas en micelio.

La Spd fue la poliamina libre más abundante en el micelio de *S. sclerotiorum* cultivado en agar Czapek-Dox durante 48 horas (Fig. 21). El nivel de Put libre fue 47 veces menor que el de Spd (Fig. 21). La Spm libre fue encontrada solamente como trazas (datos no presentados). Tanto la DFMO como la DFMA redujeron drásticamente los niveles de Spd. No se detectaron efectos significativos de estos inhibidores sobre los niveles de Put libre, probablemente debido a los bajos niveles de esta diamina y a la variabilidad de los resultados de su determinación (Fig. 21). La CHA causó una disminución significativa de los niveles de Spd libre, la cual estuvo también asociada con un aumento significativo de los niveles de Put libre.

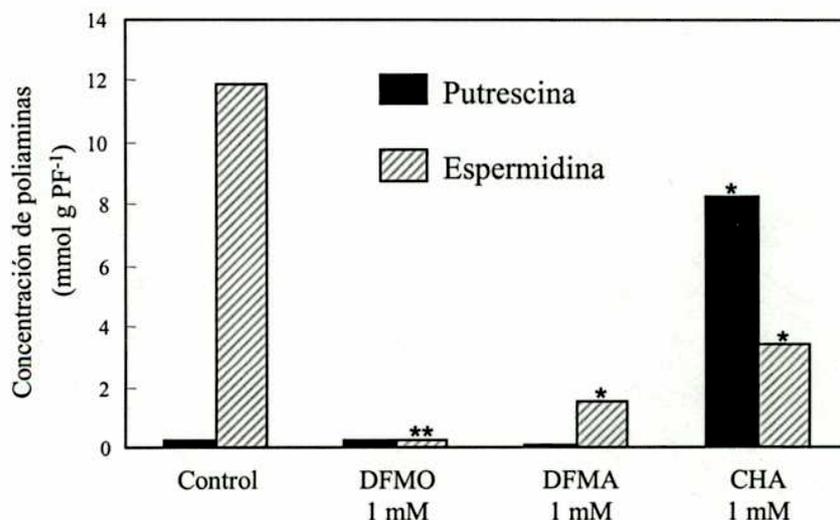


Figura 21.- Efecto de inhibidores de la síntesis de poliaminas sobre los niveles de poliaminas libres en micelio de *S. sclerotiorum*.

El hongo se cultivó 48 h a 24 °C en medio sólido suplementado con los inhibidores. Luego se determinó la concentración de poliaminas libres en micelio de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los resultados son el promedio de 3 a 5 repeticiones \pm DS. Diferencias significativas entre el control (sin inhibidores) y los tratamientos se muestran como: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

R. 2. Biosíntesis de poliaminas en micelio de *S. sclerotiorum*.

R. 2. 1. Liberación de dióxido de carbono a partir de sustratos radioactivos en micelio y efecto de inhibidores.

La L-[1-¹⁴C]ornitina fue descarboxilada eficientemente por el micelio de *S. sclerotiorum*, mientras que no se liberó dióxido a partir de la L-[1-¹⁴C]arginina (Tabla 11). La DFMO y la DFMA redujeron la descarboxilación de L-[1-¹⁴C]ornitina en un 68 y un 40 % respectivamente. Se llevaron a cabo experimentos con el fin de determinar si dichos inhibidores no afectaron la incorporación de los sustratos radioactivos por parte de las células del micelio. De este modo, se determinó si la DFMO y la DFMA compiten por la entrada a las células con la ornitina y la arginina respectivamente. En el primer experimento se estudió la cinética de incorporación de ambos aminoácidos a lo largo del tiempo de incubación. La incorporación de arginina fue algo más rápida que la de ornitina, aunque un tiempo de incubación de 2 h 15 min fue suficiente para que se incorpore más del 90 % de la cantidad inicial de ambos aminoácidos (Fig. 22a-b). La incorporación de los aminoácidos fue acompañada por la liberación de ¹⁴CO₂. El nivel máximo de liberación de ¹⁴CO₂ a partir de arginina se alcanzó durante la primer hora de incubación (Fig. 22a), mientras que en el caso de la ornitina, el punto equivalente se alcanzó entre la primera y la segunda hora de incubación (Fig. 22b). La incorporación de ornitina radioactiva no fue afectada por la presencia de DFMO en el medio de incubación, ni siquiera a la máxima concentración de inhibidor usada (2 mM, fig. 23). Como era de esperar, la ornitina no radioactiva usada como control positivo disminuyó la incorporación de ornitina radioactiva en todo el rango de concentraciones estudiado y una concentración de 1 mM de ornitina fría resultó en un 100 % de inhibición de la incorporación. En forma semejante, la DFMA no disminuyó la incorporación de arginina por el micelio (datos no presentados). De este modo, resulta evidente que los efectos de la DFMO y la DFMA sobre la descarboxilación de ornitina y arginina *in vivo* (Tabla 11) no se deben a fenómenos de competencia entre los inhibidores y los aminoácidos por la entrada a la célula. Por otra parte, en este experimento el micelio fue incubado

con los inhibidores durante 4,5 horas antes del agregado de los aminoácidos radioactivos, un tiempo que no es suficiente para que ocurra una inhibición notable del crecimiento de micelio. De este modo, los efectos de los inhibidores sobre la actividad de ODC tampoco se debieron a una disminución del crecimiento. Por otra parte, se detectó una importante liberación de $^{14}\text{CO}_2$ cuando el micelio fue incubado en presencia de L-[guanido- ^{14}C]arginina y de [^{14}C]urea (Tabla 11). La liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina fue 3,3 veces mayor que la detectada a partir de L-[1- ^{14}C]ornitina. Por su parte, cuando el micelio fue incubado en presencia de [^{14}C]urea, la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ fue 42 veces superior a la que ocurrió en presencia de L-[1- ^{14}C]ornitina.

Tabla 11. Producción de $^{14}\text{CO}_2$ en micelio incubado con sustratos radioactivos y efecto del agregado de inhibidores.

Sustrato	Inhibidor	Actividad ($\text{pmol } ^{14}\text{CO}_2 [\text{mg peso fresco}]^{-1} \text{ h}^{-1}$)
L-[1- ^{14}C]ornitina	Ninguno	1,43 \pm 0,13
	DFMO 1 mM	0,54 \pm 0,06***
	DFMA 1 mM	0,86 \pm 0,08**
L-[1- ^{14}C]arginina	Ninguno	n.d.
L-[guanido- ^{14}C]arginina	Ninguno	4,68 \pm 0,85
[^{14}C]urea	Ninguno	59,90 \pm 20,40

Se cultivó micelio a 24 °C durante 2 días en placas ‘multiwell’ de 24 pocillos conteniendo caldo Czapek-Dox. La producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de sustratos radioactivos fue determinada tal como se describió en la sección MM.4. Los resultados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS y fueron analizados usando el test de Student. Las diferencias significativas entre el control (sin inhibidor) y los tratamientos se muestran de la siguiente manera: ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. n.d.: no detectable.

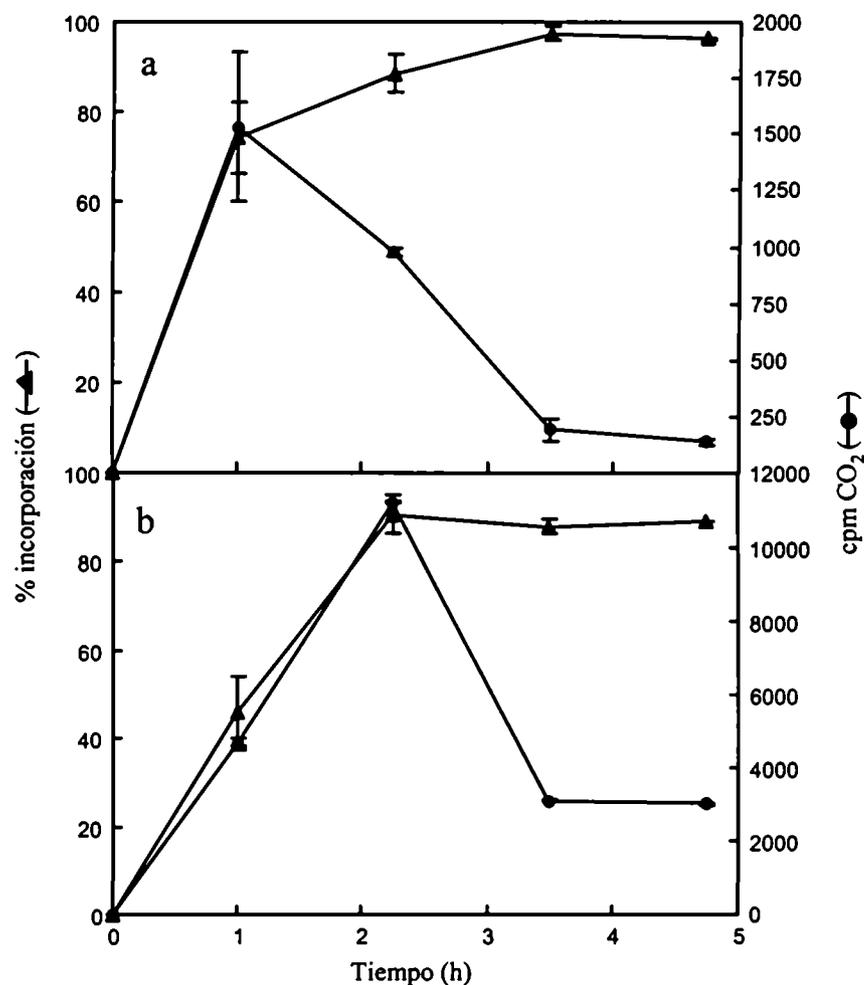


Figura 22.- Incorporación y descarboxilación de precursores de la biosíntesis de poliaminas por el micelio de *S. sclerotiorum*. Placas 'multiwell' de 24 pocillos fueron inoculadas con discos de micelio tal como se describió en la sección MM.4. Las mismas se incubaron a 24 °C durante 48 h. Al cabo de ese tiempo se agregó a cada pocillo 0,1 μ Ci de L-[1-¹⁴C]ornitina (a) o L-[U-¹⁴C]arginina (b) y se colocó una trampa para dióxido de carbono. A intervalos de una hora se reemplazaron las trampas por otras y además se tomaron muestras de 10 μ l del sobrenadante del medio de incubación. La cantidad de arginina u ornitina radioactiva remanente en dichas fracciones se determinó luego de mezclarlas con 1 ml de solución de centelleo para muestras acuosas. La cantidad de CO₂ radioactivo presente en las trampas se determinó tal como se describió en la sección MM.4.

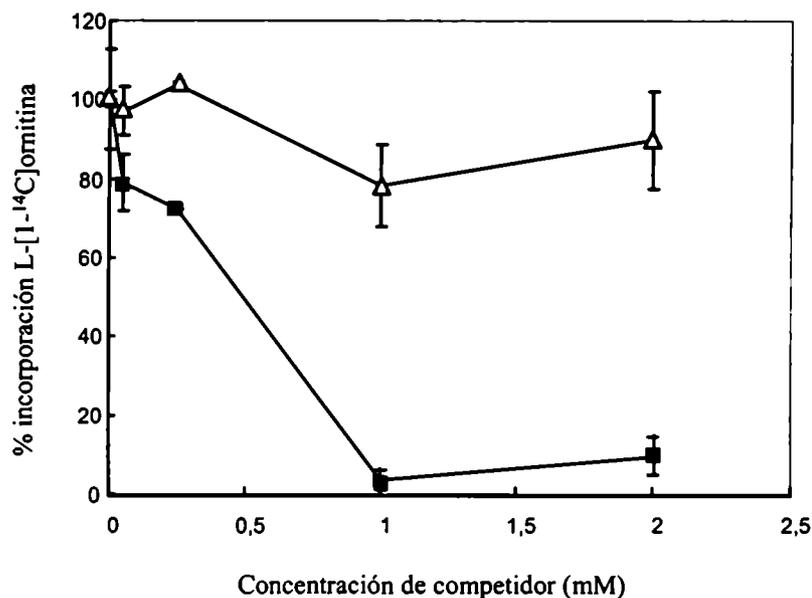


Figura 23.- Efecto de la DFMO sobre la incorporación de ornitina por parte del micelio de *S. sclerotiorum*.

Placas 'multiwell' de 24 pocillos fueron inoculadas con discos de micelio tal como se describió en la sección MM.4. Las mismas se incubaron a 24 °C durante 48 horas. Al cabo de ese tiempo se agregó a cada pocillo 0,1 μCi de L-[1-¹⁴C]ornitina y distintas cantidades de DFMO (—Δ—) u ornitina no radioactiva (—■—).

R. 2. 2.- Liberación de ¹⁴CO₂ a partir de sustratos radioactivos en extractos libres de células y efecto de inhibidores.

Los extractos de micelio descarboxilaron la L-[1-¹⁴C]ornitina, mientras que no se liberó ¹⁴CO₂ a partir de L-[1-¹⁴C]arginina (Tabla 12). La DFMO (1mM) disminuyó la descarboxilación de L-[1-¹⁴C]ornitina en un 37 %, mientras que la misma concentración de DFMA no tuvo efecto sobre la descarboxilación de dicho aminoácido (Tabla 12). Al igual que en los ensayos *in vivo*, en este caso también se detectó liberación de ¹⁴CO₂ cuando el extracto de micelio se incubó con L-[guanido-¹⁴C]arginina y [¹⁴C]urea. En estos casos, las cantidades de ¹⁴CO₂ liberadas fueron respectivamente 47 y 394 veces superiores a la que se liberó cuando el extracto fue incubado con L-[1-¹⁴C]ornitina.

La generación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina no fue afectada por el agregado de un exceso (10 mM) de agmatina u ornitina no radioactivas (Tabla 12). El agregado de urea no radioactiva (10 mM) disminuyó la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina en un 34 %, pero no afectó la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[1- ^{14}C]ornitina (Tabla 12).

Tabla 12.- Producción de $^{14}\text{CO}_2$ en extractos libres de células de micelio incubados con sustratos radioactivos y efecto del agregado de inhibidores.

Sustrato	Agregado	Actividad específica (nmol CO_2 [mg protein] $^{-1}$ h $^{-1}$)
L-[1- ^{14}C]ornitina	Ninguno	4,36 ± 0,74
	DFMO 1 mM	2,76 ± 0,59*
	DFMA 1 mM	4,19 ± 1,69
	Urea 10 mM	5,80 ± 0,77
L-[1- ^{14}C]arginina	Ninguno	n.d.
L-[guanido- ^{14}C]arginina	Ninguno	206,90 ± 15,05
	Agmatina 10 mM	206,75 ± 7,35
	Urea 10 mM	135,95 ± 9,70***
	Ornitina 10 mM	204,80 ± 8,12
[^{14}C]urea	Ninguno	1.720,00 ± 55,00

El micelio fue cultivado en caldo Czapek-Dox a 24 °C durante 3 días. Se obtuvieron extractos de micelio y se evaluó la producción $^{14}\text{CO}_2$ a partir de distintos sustratos radioactivos, tal como se describió en la sección MM.4. Los resultados son el promedio de 3 repeticiones ± DS y fueron analizados usando el test de Student. Las diferencias significativas entre los controles (sin inhibidor) y los tratamientos se muestran de la siguiente manera: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$, n.d.: no detectable.

DISCUSIÓN

D. 1.- Metabolismo de poliaminas en *S. sclerotiorum*.

Al igual que en muchos hongos, la Spd fue la poliamina libre más abundante en micelio en activo crecimiento. La DFMO resultó un inhibidor poderoso del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum*. Un fenómeno

semejante ha sido descrito en otros hongos (Biondi *et al.*, 1993; Walters, 1995; El Ghachtouli *et al.*, 1996; Khurana *et al.*, 1996; Saftner *et al.*, 1997; Walters & Mackintosh, 1997). La inhibición causada por la DFMO no es sorprendente, dado que se ha demostrado que la mayoría de los hongos sintetizan poliaminas únicamente por la vía de la ODC (Cohen, 1998). En el presente trabajo, la inhibición del crecimiento de micelio causada por la DFMO resultó de la inhibición de la ODC, tal como lo demuestran las siguientes líneas de evidencia: (1) Cuando se agregó DFMO al medio de crecimiento del hongo, se produjo una disminución drástica de los niveles de Spd libre, la poliamina más abundante en micelio. Es probable que los niveles de Put libre también hayan disminuido en presencia de DFMO, pero los bajos niveles de la misma y la variabilidad en los resultados no permitieron detectar diferencias significativas con los controles. (2) La inhibición del crecimiento causada por la DFMO fue revertida totalmente por el agregado de Put al medio de crecimiento. (3) La actividad de ODC, estimada en base a la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[1- ^{14}C]ornitina, fue inhibida por la DFMO, tanto en extractos libres de células de micelio, así como también *in vivo*.

La DFMA resultó tan poderosa como la DFMO en cuanto a su capacidad de inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum*. Varios autores han descrito fenómenos semejantes en otros hongos (Smith *et al.*, 1990; Gamarnik *et al.*, 1994). Esto resulta sorprendente, debido a la supuesta ausencia de ADC en hongos. Otros autores han investigado si existe actividad de ADC en algunos hongos cuyo crecimiento resulta inhibido por la DFMA, llegando a una conclusión positiva (Biondi *et al.*, 1993; Fornalé *et al.*, 1999; Gamarnik *et al.*, 1994; Zarb & Walters, 1994). Por lo tanto, en este trabajo de tesis se decidió dilucidar las bases bioquímicas de la inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* causada por la DFMA y determinar además si existe actividad de ADC en este hongo.

Si existiera actividad de ADC, y la disminución del crecimiento causada por la DFMA se debiera a la inhibición de dicha enzima, sería de esperar que tales efectos fueran revertidos por el agregado de Put. A diferencia de lo ocurrido con la DFMO, la inhibición no fue revertida en forma total por el agregado de Put al medio de cultivo. Del mismo modo, la agmatina (intermediario en la síntesis de Put a partir de arginina en otros organismos)

tampoco revirtió la inhibición causada por la DFMA. Estas observaciones están en contra de la existencia de ADC. Sin embargo, cuando se estudió el efecto de los inhibidores sobre los niveles de poliaminas libres, se encontró que la DFMA causó una disminución de los niveles de Spd libre, en forma semejante a lo observado con DFMO. Esto sugeriría la existencia de actividad de ADC en micelio. Para aclarar las aparentes contradicciones se llevaron a cabo estudios de producción $^{14}\text{CO}_2$ a partir de diferentes sustratos radioactivos, tanto en micelio como en extractos libres de células obtenidos a partir del mismo. Cuando se incubó micelio con L-[1- ^{14}C]ornitina se liberó $^{14}\text{CO}_2$. Dicho fenómeno se debe a la actividad de ODC, tal como lo demuestra la inhibición del mismo por la DFMO. Por el contrario, cuando el micelio fue incubado con L-[1- ^{14}C]arginina, la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ liberado fue nula. Las diferencias en el grado de descarboxilación de ambos sustratos radioactivos no puede explicarse en términos de una menor incorporación de arginina que ornitina, ya que experimentos realizados a tal efecto demostraron que la arginina es incorporada más rápidamente que la ornitina.

En forma semejante a los resultados obtenidos con micelio, cuando se incubaron ambos sustratos radioactivos con extractos libres de células del mismo, solamente se detectó liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[1- ^{14}C]ornitina. En consecuencia, ambos tipos de experimentos demuestran la ausencia de actividad de ADC en micelio del hongo. Para aclarar las causas de la inhibición del crecimiento provocada por la DFMA, se llevaron a cabo más experimentos con otros sustratos radioactivos e inhibidores.

En hongos y plantas existe actividad de arginasa, la cual convierte la arginina en ornitina, permitiendo que ambos aminoácidos sirvan como sustrato para la síntesis de Put por la vía de la ODC. Para explicar la inhibición del crecimiento de micelio de *Botrytis cinerea* causada por la DFMA, Smith *et al.* (1990) sugirieron que por su semejanza estructural con la arginina, dicho inhibidor podría actuar como sustrato de la arginasa y convertirse en DFMO, en forma semejante a lo que ocurre en plantas (Slocum & Galston, 1985). Por lo tanto, la DFMO formada podría inhibir la ODC y en consecuencia afectar el crecimiento del hongo. De este modo, aun cuando no hubiera actividad de ADC, la DFMA podría inhibir el crecimiento por el mecanismo propuesto. Una

hipótesis similar fue propuesta por Walters *et al.* (1995) para explicar la inhibición de la actividad de ODC de *Phytophthora infestans* por la DFMA.

La liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina, tanto en micelio como en extractos libres de células, puede haber resultado de alguno de los dos mecanismos siguientes: (1) la conversión de L-[guanido- ^{14}C]arginina en ornitina no radioactiva y [^{14}C]urea por la arginasa y la subsiguiente conversión de la [^{14}C]urea en $^{14}\text{CO}_2$ por la ureasa o (2) la conversión de L-[guanido- ^{14}C]arginina en [^{14}C]NCP por la ADC y la AIH, y la subsiguiente conversión de la [^{14}C]NCP en Put no radioactiva y $^{14}\text{CO}_2$ por la NCP AH. Se ha demostrado que la segunda vía es activa en plantas (Slocum, 1991). Sin embargo, en aquellos hongos en los cuales se ha postulado la existencia de ADC, no se ha elucidado la vía completa que llevaría a la producción de Put a partir de arginina. Si la primera vía fuera activa en *S. sclerotiorum*, la urea no radioactiva debería disminuir la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ liberado a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina. Si por el contrario, la segunda vía fuera activa en este hongo, entonces la agmatina no radioactiva debería disminuir la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ liberado a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina. En este trabajo de tesis, la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina en extractos libres de células disminuyó en un 37 % cuando se agregó urea no radioactiva (10 mM) al medio de incubación. Por el contrario, dicha reacción no fue afectada por el agregado de agmatina no radioactiva en la misma concentración. Para corroborar que la concentración de urea usada no ejerciera efectos inespecíficos tales como desnaturalización de enzimas en general, se midió la actividad de ODC en extractos libres de células incubados con urea 10 mM. La actividad de ODC no se vio afectada por esa cantidad de urea, por lo que se puede descartar que los efectos de ésta sobre la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina sean inespecíficos. Es probable que el efecto negativo de la urea sobre la generación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina no haya alcanzado mayor magnitud debido a que la actividad de ureasa fue muy alta, tal como lo demuestra la gran liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de [^{14}C]urea. En conjunto, los resultados demuestran que existe suficiente actividad de arginasa en micelio de *S. sclerotiorum*, la cual podría catalizar la conversión de DFMA en DFMO. Además, la falta de efecto de la agmatina no radioactiva sobre la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina provee evidencias

adicionales acerca de la ausencia de actividad de ADC en micelio de este hongo. De todas maneras, un punto aun sin explicación es la ineficacia de la Put en revertir la inhibición del crecimiento de micelio causada por la DFMA. Es probable que este inhibidor, además de afectar indirectamente la actividad de ODC, interfiera además con algún otro proceso metabólico no relacionado con la síntesis de poliaminas.

Algunos de los autores que han postulado la existencia de actividad ADC en hongos han basado sus afirmaciones en la observación de que extractos libres de células de los mismos fueron capaces de liberar $^{14}\text{CO}_2$ cuando se los incubó con arginina uniformemente marcada (Biondi *et al.*, 1993; Fornalé *et al.*, 1999; Zarb & Walters, 1994). Dichos autores, incluyeron un exceso de ornitina no radioactiva en el medio de incubación, de manera tal que si hubiera actividad de arginasa en los extractos, la ornitina radioactiva formada se diluiría y no habría liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de la misma por acción de la ODC. Además, teniendo en cuenta las propiedades de la arginasa de otros organismos, dichos autores asumieron que la ornitina fría inhibiría la actividad de arginasa. En los experimentos hechos en extractos libres de células en este trabajo de tesis, la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina no fue afectada por la presencia de un exceso de ornitina no radioactiva en el medio de incubación. Por lo tanto, si los hongos citados más arriba tienen una alta actividad ureasa, y la arginasa es insensible a la inhibición por ornitina en forma semejante a la de *S. sclerotiorum*, los resultados obtenidos por dichos autores no necesariamente implican que haya actividad de ADC en tales microorganismos. En dichos casos, la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[guanido- ^{14}C]arginina podría deberse a la acción de la ureasa sobre la urea radioactiva formada previamente por la acción de la arginasa. Resulta evidente entonces que la L-[^{14}C]arginina es el sustrato óptimo para determinar si existe actividad de ADC por liberación de $^{14}\text{CO}_2$. Alternativamente, si se usara arginina uniformemente marcada, sería necesario agregar un exceso de urea y ornitina no radioactivas al medio de incubación. Otros autores que afirmaron encontrar actividad de ADC en hongos (Gamarnik *et al.*, 1994), si bien usaron L-[^{14}C]arginina como sustrato, no incluyeron ornitina no radioactiva en la mezcla de incubación. De este modo, el $^{14}\text{CO}_2$ que detectaron puede haberse debido a la conversión de la L-[^{14}C -

¹⁴C]arginina en L-[1-¹⁴C]ornitina y la subsiguiente descarboxilación de esta última por la ODC.

D. 2.- Relación del metabolismo de poliaminas con procesos de crecimiento y diferenciación de *S. sclerotiorum*.

En el presente trabajo de tesis también se estudió el efecto de la inhibición de la biosíntesis de poliaminas sobre el desarrollo de esclerocios. Este proceso fue afectado drásticamente por la DFMO, la DFMA y la CHA. La inhibición de dicho proceso por parte de la DFMO y la DFMA no resultó sorprendente, dada la fuerte inhibición del crecimiento de micelio causada por los mismos. Contrariamente a la inhibición del crecimiento de micelio, el efecto negativo de la DFMO sobre la formación de esclerocios fue revertido por Put solamente en forma muy leve. Experimentos realizados con bajas concentraciones de DFMO demostraron que la formación de esclerocios es mucho más sensible que el crecimiento de micelio a la inhibición de la síntesis de poliaminas. A bajas concentraciones de inhibidor, la formación de esclerocios se inhibió significativamente sin que el crecimiento de micelio resultara afectado. Por lo tanto, es probable que la formación de esclerocios requiera mayores concentraciones de poliaminas que las necesarias para mantener el crecimiento vegetativo. Resultados similares fueron reportados en relación a la transición dimórfica de *Yarrowia lipolytica* y *Ustilago maydis* (Guevara-Olvera *et al.*, 1993 y 1997). A igual concentración que la DFMO, la CHA resultó un inhibidor poderoso de la formación de esclerocios, mientras que inhibió el crecimiento de micelio en forma muy leve. La inhibición de la formación de esclerocios causada por la CHA resultó de la inhibición de la espermidina sintasa tal como lo demuestran: (1) la reversión total por el agregado de Spd al medio de crecimiento (2) la disminución de los niveles de Spd libre. La disminución de los niveles de Spd libre fue acompañada por un aumento notable de los niveles de Put, en forma semejante a lo que ocurre en otros organismos (Biondi *et al.*, 1986; Torrigiani *et al.*, 1987). Estos resultados sugieren que el crecimiento de micelio puede ser soportado tanto por Put como por Spd, mientras que los niveles de esta última son críticos para que ocurra la

formación de esclerocios. Alternativamente, es probable que la relación Put /Spd sea crítica para que ocurra la formación de esclerocios, tal como fue descrito en relación al proceso de conidiación microcíclica de *Aspergillus flavus* (Khurana *et al.*, 1996). Dado que la MGBG no inhibió el crecimiento de micelio ni la formación de esclerocios, es probable que la AdoMetDc no sea una enzima limitante para la biosíntesis de poliaminas en este hongo, al menos en nuestras condiciones de ensayo.

Tal como se describió previamente, las ascosporas son la fuente de inóculo de enfermedades causadas por *S. sclerotiorum* en varios hospedantes. La germinación de las mismas no fue afectada por los inhibidores de la síntesis de poliaminas usados en este trabajo de tesis. En forma similar, la germinación de uredosporas de *Uromyces vicia-fabae* y conidios de *Magnaphorte grisea* no resultó inhibida por la DFMO (Choi *et al.*, 1998). Es posible que las ascosporas sean impermeables a los inhibidores, o bien que tengan niveles de poliaminas suficientemente altos como para soportar la germinación aún cuando la síntesis de poliaminas se encuentre inhibida. También se ha observado que el micelio formado a partir de la germinación de ascosporas resultó sensible a la acción de los mismos inhibidores que afectaron el crecimiento de micelio en los ensayos anteriormente descritos. La determinación del momento preciso en que el micelio en desarrollo a partir de esporas germinadas se vuelve sensible a la acción de los inhibidores podría contribuir al entendimiento de la causa de la insensibilidad de las ascosporas a los mismos.

CONCLUSIONES

- La espermidina (Spd) es la poliamina libre más abundante en micelio en activo crecimiento.
- La α -difluorometil ornitina (DFMO) inhibe el crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum in vitro* como resultado de la inhibición de la actividad de ornitina descarboxilasa (ODC) y la subsiguiente disminución de los niveles de Spd.

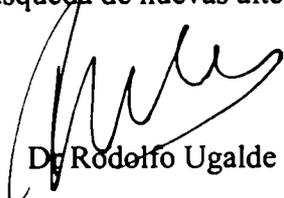
- La inhibición de la ODC resulta en una severa disminución del crecimiento de micelio. Teniendo en cuenta que las plantas poseen una vía alternativa para la síntesis de putrescina (Put), resultaría interesante estudiar el potencial de la inhibición de esta enzima como estrategia para el control de enfermedades de plantas causadas por micelio de *S. sclerotiorum*.
- No existe actividad de arginina descarboxilasa (ADC) en micelio de *S. sclerotiorum* en activo crecimiento.
- La DFMA resultó tan poderosa como la DFMO en cuanto a su capacidad de inhibición del crecimiento de micelio de *S. sclerotiorum*.
- Existe alta actividad de arginasa en micelio de *S. sclerotiorum* la cual podría catalizar la conversión de DFMA en DFMO, inhibiendo este último a la ODC y disminuyendo así el crecimiento de micelio.
- Es probable que la DFMA, además de afectar indirectamente la actividad de ODC, interfiera también con algún otro proceso metabólico no relacionado con la síntesis de poliaminas.
- La L-[1-¹⁴C]arginina es el sustrato óptimo para la determinación de actividad de ADC por liberación de ¹⁴CO₂.
- El desarrollo de esclerocios es más sensible que el crecimiento de micelio a la inhibición de la síntesis de poliaminas.
- El crecimiento de micelio puede ser soportado tanto por putrescina como por la espermidina.
- La presencia de una cierta concentración espermidina es crítica para la formación de esclerocios. Alternativamente, es probable que la relación Put /Spd sea crítica para que ocurra dicho proceso.

- Entre los distintos procesos de crecimiento y diferenciación que ocurren durante el ciclo de vida de *S. sclerotiorum*, la germinación de ascosporas es el menos sensible a los inhibidores de la síntesis de poliaminas, al menos cuando tales compuestos son usados en concentraciones no superiores a 1 mM. De este modo, la inhibición de la síntesis de poliaminas de *S. sclerotiorum* probablemente no resulte una estrategia apropiada para el control de enfermedades de plantas en las cuales las ascosporas son la fuente de inóculo.

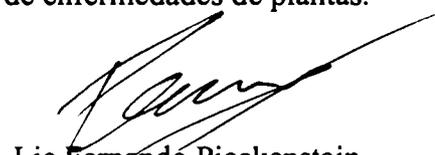
COMENTARIO FINAL

Los estudios realizados como parte de este trabajo de tesis se encuadran dentro del área de la micología, la fitopatología y la fisiología de hongos. Los mismos estuvieron centrados alrededor de *Sclerotinia sclerotiorum*, un hongo considerado como uno de los patógenos más importantes del girasol en la Argentina y en el resto del mundo. Los resultados de estos estudios se han agrupado en capítulos, al final de los cuales se han expuesto en detalle la discusión y las conclusiones correspondientes a cada tema estudiado. Por lo tanto, el propósito de esta última sección es hacer un breve comentario general.

Uno de los temas abordados fue el estudio de la interacción entre *S. sclerotiorum* y *Epicoccum purpurascens*, un hongo saprófito que otros grupos de investigación habían usado previamente con relativo éxito para el control de algunas enfermedades de plantas de origen fúngico. Además se estudió el potencial de *E. purpurascens* para el control de la podredumbre de capítulos de girasol causada por *S. sclerotiorum*: Por otra parte, se hizo una caracterización parcial de los compuestos antifúngicos producidos por *E. purpurascens* y el potencial de la aplicación de los mismos para el control de algunas enfermedades del girasol causadas por *S. sclerotiorum*. Finalmente, se llevaron a cabo estudios sobre el metabolismo de poliaminas en *S. sclerotiorum*, determinando el rol de las mismas en procesos de crecimiento y diferenciación que son claves para la supervivencia y la patogenicidad del hongo en cuestión. Además se estudiaron las consecuencias de la perturbación deliberada del metabolismo de tales compuestos sobre los fenómenos antedichos, haciendo de este modo una aproximación preliminar a la determinación del potencial de la inhibición de la síntesis de poliaminas como estrategia para el control de enfermedades de plantas causadas por *S. sclerotiorum*. En conjunto todos los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento científico dentro de cada una de las áreas citadas al principio de este apartado y además constituyen un aporte a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades de plantas.



Dr Rodolfo Ugalde
Director de tesis



Lic Fernando Pieckenstein
Tesisista

BIBLIOGRAFÍA

Adams PB (1990). The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* **28**: 59-72.

Adams PB & DR Fravel (1990). Economical biological control of *Sclerotinia* lettuce drop by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology* **80**: 1120-1124.

Alström S (1991). Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *Journal of General and Applied Microbiology* **37**: 495-501.

Anas O & RD Reeleder (1988). Consumption of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by larvae of *Bradysia coprophila*: influence of soil factors and interactions between larvae and *Trichoderma viride*. *Soil Biology and Biochemistry* **20**: 619-624.

Andrews JH (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 603-635.

Asher MJC (1978). Interactions between isolates of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*. *Transactions of the British Mycological Society* **71**: 367-73.

Autino H, F Wnuk & P Vaca (1993). Historial, presente y futuro de una oleaginosa atractiva: el Girasol. *Aceites y grasas* **12**: 21-30.

Bailey A, E Mueller & P Bowyer (2000). Ornithine decarboxylase of *Stagonospora (Septoria) nodorum* is required for virulence toward wheat. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 14242-14247.

Baker KF & RJ Cook (1974). Biological control of plant pathogens, WH Freeman, San Francisco, USA.

Bamford PC, GLF Norris & G Ward (1961). Flavipin production by *Epicoccum* spp. *Transactions of the British Mycological Society* **44**: 354-356.

Banuett F (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends in Genetics* **8**: 174-180.

Baute MA, G Deffieux, R Baute & A Neveu (1978). New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. I. Fermentation, isolation and antibacterial properties. *The Journal of Antibiotics* **31**: 1099-1105.

Bey P, C Danzin & M Jung (1987). Inhibition of basic amino acid decarboxylases involved in polyamine biosynthesis. In *Inhibition of Polyamine Metabolism* (eds PP McCann, AE Pegg & A Sjordesma) pp 1-31, Academic Press, Orlando, USA.

Biondi S, N Bagni & A Sansovini (1986). Dicyclohexylamine uptake and effects on polyamine content in cultured cotyledons of radiata pine. *Physiologia Plantarum* **66**: 41-45.

Biondi S, I Polgrosso & N Bagni (1993). Effect of polyamine biosynthesis inhibitors on mycelial growth and concentrations of polyamines in *Ophiostoma ulmi* (Buism.) Nannf. *New Phytologist* **123**: 415-419.

Blakeman JP & NJ Fokkema (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology* **20**: 167-192.

Boland GJ (1992). Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**:10-17.

Boland GJ & R Hall (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **16**: 93-108.

Boland GJ & GD Inglis (1989). Antagonism of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of bean by fungi from bean and rapeseed flowers. *Canadian Journal of Botany* **67**: 1775-1781.

Borrel Azlor A (1996). Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Barcelona.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the method of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Brawley JV & AJ Ferro (1979). Polyamine biosynthesis during germination of yeast ascospores. *Journal of Bacteriology* **140**: 649-654.

Brown AE, R Finlay & JS Ward (1987). Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **19**: 657-664.

Burge WR, LJ Buckley, JD Sullivan Jr, CJ Mc Grattan & M Ikawa. (1976). Isolation and biological activity of the pigments of the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **24**: 555-559.

Caffaro S, S Scaramagli, F Antognoni & N Bagni (1993). Polyamine content and translocation in soybean plants. *Journal of Plant Physiology* **141**: 563-568

Calvo-Mendez C, M Martínez Pacheco & J Ruiz Herrera (1987). Regulation of ornithine decarboxylase in *Mucor bacilliformis* and *Mucor rouxii*. *Experimental mycology* **11**: 270-277.

Casero Jr RA & PE Pegg (1993). Spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase-The turning point in polyamine metabolism. *FASEB Journal* **7**: 653-661

- Castaño F, F Vear & D Tourvieille de Labrouhe (1993). Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. *Euphytica* **68**: 85-98.
- Chand T & C Logan (1984). Antagonists and parasites of *Rhizoctonia solani* and their efficacy in reducing stem canker of potato under controlled conditions. *Transactions of the British Mycological Society* **83**: 107-112.
- Chet I. (1987). *Trichoderma*- application, mode of action and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In *Innovative Approaches to Plant Disease Control* (ed I. Chet.), pp 137-160, John Wiley, New York, USA.
- Choi GH & DL Nuss (1992). Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* **257**: 800-803.
- Cohen SS (1998). *A Guide to the Polyamines*, Oxford University Press, New York, USA.
- Cook JR (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 53-80.
- Cook RJ & KR Baker (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Curl EA & B Truelove (1986). *The Rhizosphere*, Springer-Verlag, New York, USA.
- Deacon JW (1973). Control of the take-all fungus by grass leys in intensive cereal cropping. *Plant Pathology* **22**: 88-94.
- Deacon JW (1976). Biological control of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* by *Phialophora radicicola* and similar fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **8**: 275-83.
- De Agazio M, M Zachinni, R Frederico & S Grego (1995). Putrescine accumulation in maize roots treated with spermidine. Evidence for spermidine to putrescine conversion. *Plant Science* **111**: 181-185.
- De Agazio M, S Grego, M Zachinni, F De Cesare, F Cellai, L Rizea-Savu & L Silvestro (1996). 1-*N*-acetylspermidine in roots of maize seedlings. *Plant Science* **121**: 143-149.
- Dickman MB & A Mitra (1992). *Arabidopsis thaliana* as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **41**: 255-263.

- Dickinson CH (1967). Fungal colonisation of *Pisum* leaves. *Canadian Journal of Botany* **45**: 915-927.
- Dos Santos AF & OD Dhingra (1982). Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* **60**: 472-475.
- Dubos B (1984). Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevines by an antagonistic strain of *Trichoderma harzianum*. In *Current Perspectives in Microbial Ecology* (ed MJ Klub & CA Reedy), pp 370-373, American Society of Microbiology, Washington DC, USA.
- El Gachtouli NE, M Paynot, J Martin-Tanguy, D Morandi & S Gianinazzi (1996). Effect of polyamines and polyamine biosynthesis inhibitors on spore germination and hyphal growth of *Glomus mosseae*. *Mycological Research* **100**: 597-600.
- Expert JM & B Digat (1995). Biocontrol of *Sclerotinia* wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putidas* strains. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 685-691.
- Falconi CJ & K Mendgen (1994). Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz* **101**: 38-47.
- Fiss M, N Kucheryava, J Schonherr, A Kollar, G Arnold & G Auling (2000). Isolation and characterization of epiphytic fungi from the phyllosphere of apple as potential biocontrol agents against apple scab (*Venturia inaequalis*). *Journal of Plant Disease Protection* **107**: 1-11.
- Fokkema NJ (1981). Fungal leaf saprophytes, beneficial or detrimental? In *Microbial ecology of the phylloplane* (ed PJ Blakeman), pp 433-454, Academic Press, London, UK.
- Fokkema NJ (1996). Biological control of fungal plant diseases. *Entomophaga* **41**: 333-342.
- Ford EJ, RV Miller, H Gray & JE Sherwood (1995). Heterokaryon formation and vegetative compatibility in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research* **99**: 241-247.
- Fornalé S, T Sarjala & N Bagni (1999). Endogenous polyamine content and metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* **143**: 581-587.
- Fravel DR (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 75-91.

- Frederick CB, PJ Szaniszlo, PE Vickrey, MD Bentley & W Shive (1981). Production and isolation of siderophores from the soil fungus *Epicoccum purpurascens*. *Biochemistry* **20**: 2432-2436.
- Gamarnik A, RB Frydman & D Barreto (1994). Prevention of infection of soybean seeds by *Colletotrichum truncatum* by polyamine biosynthesis inhibitors. *Phytopathology* **84**: 1445-1448.
- Gribanovski-Sassu O & H Foppen (1967). The carotenoids of the fungus *Epicoccum nigrum* Link. *Phytochemistry* **6**: 907-909.
- Guevara-Olvera L, C Calvo-Mendez & J Ruiz Herrera (1993). The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of General Microbiology* **193**: 485-493.
- Guevara-Olvera L, B Xonocostle-Cázares & J Ruiz Herrera (1997). Cloning and disruption of the ornithine decarboxylase gene of *Ustilago maydis*: evidence for a role of polyamines in its dimorphic transition. *Microbiology* **143**: 2237-2245.
- Gulya TJ (1985). Evaluation of sunflower germplasm for resistance to *Sclerotinia* stalk rot and race 3 downy mildew. *Actas de la XI Conferencia Internacional de Girasol*, Tomo II: 349-353, Mar del Plata, Argentina.
- Gunasekaran M & U Gunasekaran (1999). Partial purification and properties of putrescine oxidase from *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **76**: 229-236.
- Gurusiddaiah S, DM Weller, A Sarkar & RJ Cook (1986). Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **29**: 488-495.
- Gutteridge RJ & DB Slope (1978). Effects of inoculating soils with *Phialophora radiculicola* var *graminicola* on take-all disease of wheat. *Plant Pathology* **27**: 131-135.
- Gutterson NI., TJ Layton, JS Zeigle, GJ Warren (1986). Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent Pseudomonad. *Journal of Bacteriology* **165**: 696-703.
- Hamana K & S Matsuzaki (1985a). Further study on polyamines in primitive unicellular eukaryotic algae. *Journal of Biochemistry* **97**: 1311-1315.
- Hamana K & S Matsuzaki (1985b). Distinct differences in the polyamine compositions of bryophyta and pteridophyta. *Journal of Biochemistry* **97**: 1595-1601.

Hamana K, S Matsuzaki, M Niitsu & K Samejima (1989). Polyamine distribution and the potential to form novel polyamines in phytopathogenic agrobacteria. *FEMS Microbiology Letters* **65**: 269-274.

Hannusch DJ & GJ Boland (1996). Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on grey mold of bean. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 133-142.

Haywood GW & PJ Large (1985). The occurrence, subcellular localization and partial purification of diamine acetyltransferase in the yeast *Candida boidinii* grown on spermidine or putrescine as sole nitrogen source. *European Journal of Biochemistry* **148**: 277-283.

Herrero AB, MC López, S García, A Schmidt, F Spaltmann, J Ruiz-Herrera & A Domínguez (1999). Control of filament formation in *Candida albicans* by polyamine levels. *Infection and Immunity* **67**: 4870-4878.

Howell CR & RD Stipanovic (1983). Gliovirin, a new antibiotic of *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 321-24.

Huang HC & JA Hoes (1976). Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. *Canadian Journal of Botany* **54**: 406-410.

Huang HC & EG Kokko (1987). Ultrastructure of hyperparasitism of *Coniothyrium minitans* on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* **65**: 2483-2489.

Hunt MD, UH Neuenschwander, TP Delaney, KB Weymann, LB Friedrich, KA Lawton, HY Steiner & JA Ryals (1996). Recent advances in systemic acquired resistance- a review. *Gene* **179**: 89-95.

Igarashi K & K Kashiwagi (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**: 559-564.

Igarashi K, I Sakamoto, N Goto, K Kashiwagi, R Honma & S Hirose (1982). Interaction between polyamines and nucleic acids or phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **219**: 438-443.

Ikawa M, CJ McGrattan, WR Burge, RC Iannitelli, JJ Uebel & T Noguchi (1978). Epirocin, a polyene antibiotic from the mould *Epicoccum nigrum*. *Journal of Antibiotics* **31**: 159-161.

Inderlied CB, RL Cihlar & PS Sypherd (1980). Regulation of ornithine decarboxylase during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology* **141**: 699-706.

Inglis GD & GJ Boland (1990). The microflora of bean and rapeseed petals and the influence of the microflora of bean petals on white mold. *Canadian Journal of Plant Pathology* **12**: 129-134.

Inglis GD & GJ Boland (1992). Evaluation of filamentous fungi isolated from petals of bean and rapeseed for suppression of white mold. *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 124-129.

Jachmann H & H Fehrmann (1989). Effect of phyllosphere microorganisms on senescence of wheat leaves. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz* **96**: 124-133.

Kesarwani M, M Azam, K Natarajan, A Mehta & A Datta (2000). Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 7230-7238.

Khurana N, RK Saxena, R Gupta & MV Rajam (1996). Polyamines as modulators of microcycle conidiation in *Aspergillus flavus*. *Microbiology* **142**: 517-523

Kerr A (1980). Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Disease* **64**: 25-30.

Kilpatrick JA & GA Chilvers (1981). Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. *Transactions of the British Mycological Society* **77**: 497-508.

Kloepper JW, S Tuzun & JA Kué (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology* **2**: 349-351.

Kohli Y, RAA Morrall, JB Anderson & LM Kohn (1992). Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. *Phytopathology* **82**: 875-880.

Kobayashi Y, T Higashi, H Machida, S Iwasaki & K Horikoshi (1983). Oxidation of acetylpolyamines by extracellular polyamine oxidase produced by *Penicillium* sp No. PO-1. *Biochimica et Biophysica Acta* **743**: 341-346.

Kobayashi Y & K Horikoshi (1982). Purification and characterization of extracellular polyamine oxidase produced by *Penicillium* sp No. PO-1. *Biochimica et Biophysica Acta* **705**: 133-138.

Kommendahl T & C Windels (1981). Introduction of microbial antagonists to specific courts of infection: seeds, seedlings and wounds. In *Biological Control in Crop Production* (ed G C Papavizas), pp 227-248. Beltsville Symposium on Agricultural Research 5, Allanheld, Osmun, Granada.

- Large PJ (1992). Enzymes and pathways of polyamine breakdown in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* **88**: 249-262.
- Liu L, JW Kloepper & S Tuzun (1995). Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **85**: 843-847.
- López MC, S García, J Ruiz-Herrera & A Dominguez (1997). The ornithine decarboxylase gene from *Candida albicans*. Sequence analysis and expression during dimorphism. *Current Genetics* **32**: 108-114.
- Madrigal C, S Pascual & P Melgarejo (1994). Biological control of peach twig blight induced by *Monilinia laxa* with *Epicoccum nigrum*. *Plant Pathology* **43**: 554-561.
- Madrigal C, JL Tadeo & P Melgarejo (1991). Relationship between flavipin production by *Epicoccum purpurascens* and antagonism against *Monilinia laxa*. *Mycological Research* **95**: 1375-81.
- Marcé M, DS Brown, T Capell, X Figueras & AF Tiburcio (1995). Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plants and animal tissues. *Journal of Chromatography B* **666**: 329-335
- Marciano P, P Di Lenna & P Magro (1983). Oxalic acid, cell wall degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology* **22**: 339-345.
- Martinez JP, JL López-Ribot, ML Gil, R Sentandreu, & J Ruiz-Herrera (1990). Inhibition of the dimorphic transition of *Candida albicans* by the ornithine decarboxylase inhibitor 1,4-diaminobutanone: alterations in the glycoprotein composition of the cell wall. *Journal of General Microbiology* **136**: 1937-1943.
- Marton LJ & DR Morris (1987). Molecular and cellular functions of the polyamines. In *Inhibition of Polyamine Biosynthesis: Biological Significance and Basis for New Therapies* (ed PP McCann, AE Pegg & A Sjordesma), pp 79-105. Academic Press: New York.
- Maurhofer M, C Hase, P Meuwly, JP Métraux & G Défago (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84**: 139-146.
- McLoughlin TJ, JP Quinn, A Bettermann R Bookland (1992). *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1760-1763.

McQuilken MP & JM Whipps (1995). Production, survival and evaluation of soil-substrate inocula of *Coniothyrium minitans* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* **101**: 101-110.

Menucci L, S Rojas & EP Caramago (1975). Polyamines and ornithine decarboxylase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *Biochimica et Biophysica Acta* **404**: 249-256.

Mercier J & RD Reeleder (1987). Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and other fungi on the phylloplane of lettuce. *Canadian Journal of Botany* **65**: 1633-1637.

Mitchell JL & HP Rusch (1973). Regulation of polyamine synthesis in *Physarum polycephalum* during growth and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* **297**: 503-516.

Nishikawa M, T Hagishita, H Yurimoto, N Kato, Y Sakai & T Hatanaka (2000). *FEBS Letters* **476**: 150-154.

Odds FC (1988). *Candida* and candidosis. A review and bibliography. Baillière-Tindall, Londres, UK

Odejijono MAL & C Dragar (1993). Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **25**: 247-250.

Papavizas GC & RD Lumsden (1980). Biological control of soilborne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology* **18**: 389-413.

Paulus TJ, P Kiyono & RH Davis (1982). Polyamine-deficient *Neurospora crassa* mutants and synthesis of cadaverine. *Journal of Bacteriology* **152**: 291-297.

Pegg AE & S McGill (1979). Decarboxylation of ornithine and lysine in rat tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* **568**: 416-427

Pegg AE & HG Williams-Ashman (1987). Pharmacologic interference with enzymes of polyamine biosynthesis and of 5'-methylthioadenosine metabolism. In *Inhibition of Polyamine Biosynthesis: Biological Significance and Basis for New Therapies* (eds PP McCann, AE Pegg & A Sjordesma), pp 33-48. Academic Press, New York, USA.

Peres A, Y Regnault. & JG Pierre (1986). Recherche d'une méthode de lutte contre *Sclerotinia sclerotiorum* du capitule detournesol. *CETIOM Informations Techniques* **97**.

Pereyra VR.& AR Escande (1994). Enfermedades del girasol en la Argentina, manual de reconocimiento. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Buenos Aires Sur, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce.

Pereyra VR, ME Bazzalo & C Sala (1991). Variabilidad y estabilidad entre híbridos comerciales de girasol para la resistencia a la podredumbre de capítulo causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Actas de la Primera Reunión Nacional de Oleaginosos, Rosario, Argentina

Philion V, O Carrasco & T Paulitz (1997). *In vitro* evaluation of fungal isolates for their ability to influence leaf rheology, production of pseudothecia, and ascospores of *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 441-452.

Porter CW, U Regenass & RJ Bergeron (1992). Polyamine inhibitors and analogues as potential anticancer agents. In *Polyamines in the Gastrointestinal Tract* (eds UR Folsch & C Loser), Falk Symposium 62, Dowling, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Pugh GJ & NG Buckley (1971). The leaf surface as a substrate for colonization by fungi. In *Ecology of leaf surface microorganisms* (eds TF Preece & CH Dickinson), pp 432-445, Academic Press, London, UK.

Purdy LH (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* **69**: 875-880.

Raistrick H & P Rudman (1956). Studies in the biochemistry of microorganisms 97. Flavipin, a crystalline metabolite of *Aspergillus flavipes* (Bainier & Sartory) Thom & Church and *Aspergillus terreus* Thom. *Biochemical Journal* **63**: 395-406.

Rajam MV & AW Galston (1985). The effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on growth and morphology of phytopathogenic fungi. *Plant and Cell Physiology* **26**: 683-682.

Rajam MV, LH Weinstein & AW Galston (1985). Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **82**: 6874-6878.

Raposo R, R Colgan, J Delcan & P Melgarejo (1995). Application of an automated quantitative method to determine fungicide resistance in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* **79**: 294-296.

Rodriguez MA, N Venedekian & A Godeas (2000). Fungal populations on sunflower (*Helianthus annuus*) anthosphere and their relation to susceptibility or tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* attack. *Mycopathologia* **150**: 143-150.

Royse DJ & SM Ries (1978). The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology* **68**: 603-607.

Ruiz Herrera J, A Ruiz & E Lopez Romero (1983). Isolation and biochemical analysis of *Mucor bacilliformis* monomorphic mutants. *Journal of Bacteriology* **156**: 264-272

Rytter JL, FL Lukezic, R Craig & GW Moorman (1989). Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* **79**: 367-70.

Sackston WE (1992). On a treadmill: breeding sunflowers for resistance to disease. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 529-51.

Saftner RA, WS Conway & CE Sams (1997). Effects of some polyamine biosynthesis inhibitors and calcium chloride on *in vitro* growth and decay development in apples caused by *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **122**: 380-385

Schroth MN & JG Hancock (1982). Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* **216**: 1376-1381.

Schol-Schwarz MB (1959). The genus *Epicoccum* Link. *Transactions of the British Mycological Society* **42**: 149-173.

Shapira R, A Altman, Y Henis & I Chet (1989). Polyamines and ornithine decarboxylase activity during growth and differentiation in *Sclerotium rolfsii*. *Journal of General Microbiology* **135**: 1361-1367.

Slocum RD (1991). Polyamine biosynthesis in plants. In: *Biochemistry and physiology of polyamines in plants* (eds RD Slocum & HE Torres) pp 23-40, CRC Press, Boca Raton, USA.

Slocum RD & AW Galston (1985). *In vivo* inhibition of polyamine biosynthesis and growth in tobacco ovary tissues. *Plant Cell Physiology* **26**: 1519-1526.

Smedegaard-Petersen V & K Tolstrup (1986). Saprophytic leaf fungi limit yield in cereals. In *Microbiology of the Phyllosphere* (eds NJ Fokkema & J Van Den Heuvel) pp 160-171, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Smith TA, JHA Barker & M Jung (1990). Effect of enzyme activated inhibitors on ornithine decarboxylase and growth of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **29**: 1759-1762

Szandala ES & D Backhouse (2001). Suppression of sporulation of *Botrytis cinerea* by antagonists applied after infection. *Australasian Plant Pathology* **30**: 165-170.

Sztejnberg A, S Galper, S Mazar & N Lisker (1989). *Ampelomyces quisqualis* for biological and integrated control of powdery mildews in Israel. *Journal of Phytopathology* **124**: 285-95.

Tomashow LS, DM Weller & RJ Cook (1986). Molecular analysis of phenazine antibiotic synthesis by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. Third International Symposium on Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. McGill University, Montreal, Canada.

Torrigiani P, D Serafini-Fracassini & N Bagni (1987). Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiology* **84**: 148-152.

Trutmann P; PJ Keane & PR Merriman (1982). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on aerial parts of plants by the hyperparasite *Coniothyrium minitans*. *Transactions of the British Mycological Society* **78**: 521-529.

Tu JC (1984). Mycoparasitism by *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum* and its effect on sclerotial germination. *Phytopathologische Zeitschrift* **109**: 261-268.

Tu JC (1985). Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. *Physiological Plant Pathology* **26**: 111-117.

Van Peer R, GJ Niemann & B Schippers (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS 417r. *Phytopathology* **81**: 728-734.

Van Wees SCM, CMJ Pieterse, A Trijssenaar, YAM Van 't Westende, F Hartog & LC Van Loon (1997). Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant.-Microbe Interactions* **10**: 716-724.

Vear F & D Tourvieille (1988). Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospore infections. *Agronomie* **8**: 503-508.

Walters DR (1995). Inhibition of polyamine biosynthesis in fungi. *Mycological Research* **99**: 129-139.

Walters DR (1986). The effects of a polyamine biosynthesis inhibitor on infection of *Vicia faba* L. by the rust fungus, *Uromyces vicia-fabae* (Pers.) Schroet. *New Phytologist* **104**: 613-619.

Walters DR, JP Keenan, T Cowley, A McPherson & ND Havis (1995). Inhibition of polyamine biosynthesis in *Phytophthora infestans* and *Pythium ultimum*. *Plant Pathology* **44**: 80-85.

Walters DR & G Kingham (1990). Uptake and translocation of α -difluoromethyl ornithine, a polyamine biosynthesis inhibitor, by barley seedlings: effects on mildew infection. *New Phytologist* **114**: 659-665.

- Walters DR & CA Mackintosh (1997). Control of plant disease by perturbation of fungal polyamine metabolism. *Physiologia Plantarum* **100**: 689-695.
- Wei G, JW Kloepper & S Tuzun (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **81**: 1508-1512.
- West HM & DR Walters (1988). The effects of polyamine biosynthesis inhibitors on infection of *Hordeum vulgare* L. by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* Marchal. *New Phytologist* **110**: 193-200.
- West HM & DR Walters (1989). Effects of polyamine biosynthesis inhibitors on growth of *Pyrenophora teres*, *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium culmorum* and *Septoria nodorum* *in vitro*. *Mycological Research* **92**: 453-457.
- Whipps JM & SP Budge (1993). Transmission of the mycoparasite *Coniothyrium minitans* by collembolan *Folsomia candida* (Collembola: Entomobryidae) and glasshouse sciarid *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae). *Annals of Applied Biology* **123**: 165-171.
- Wittig HPP, KB Johnson & JW Pscheidt (1997). Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. *Plant Disease* **81**: 383-387.
- Wright JM, WP Gulliver, CJ Michalski & SM Boyle (1982). Ornithine decarboxylase activity and polyamine content during zoospore germination and hormone-induced sexual differentiation of *Achlya ambisexualis*. *Journal of General Microbiology* **128**: 1509-1515.
- Yuen GY, G Godoy, JR Steadman, ED Kerr & ML Craig (1991). Epiphytic colonization of dry edible bean by bacteria antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and potential for biological control of white mold disease. *Biological Control* **1**: 293-301.
- Zarb J & DR Walters (1994). The effects of polyamine biosynthesis inhibitors on growth, enzyme activities and polyamine concentrations in the mycorrhizal fungus *Laccaria proxima*. *New Phytologist* **126**: 99-104.
- Zhou T & GJ Boland (1998). Biological control strategies for *Sclerotinia* diseases. In *Plant-microbe interactions and biological control* (eds GJ Boland & LD Kuykendall), pp 127-156, Marcel Dekker, New York, USA.
- Zhou T & RD Reeleder (1989). Application of *E. purpurascens* spores to control white mold of snap bean. *Plant Disease* **73**: 639-642.
- Zhou T, RD Reeleder & SA Sparace (1991). Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and *Epicoccum purpurascens*. *Canadian Journal of Botany* **69**: 2503-2510.