



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados

**EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE
SÍNTOMAS DEL VIRUS DE LA “PESTE NEGRA” (TSWV) EN EL
CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Mariel Silvina Mitidieri

Tesis
Para optar al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Agropecuarias
Mención: Producción Vegetal

Córdoba, 2009

**EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE
SÍNTOMAS DEL VIRUS DE LA “PESTE NEGRA” (TSWV) EN EL
CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Mariel Silvina Mitidieri

Comisión Asesora de Tesis

**Director: Biól. Edith Taleisnik PhD. INTA-IFFIVE. Córdoba.
Comisión asesora: Ing. Agr. Elvio Biderbost. MSc.
Dra. Olga Del Longo**

Tribunal Examinador de Tesis

**Dr. Ruben Bottini
Ing. Agr. MSc Sergio Fernando Nome
Dra. Olga Del Longo**

Presentación formal académica

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba

Este trabajo no se podría haber hecho sin.....

la constante colaboración y compromiso de mis compañeros de la EEA INTA San Pedro en especial: Virginia Brambilla, Valera Saliva, Mario Piris, Martín Barbieri y Estela Piris con quienes sembramos, plantamos, inoculamos, medimos y cosechamos plantas y plantas de tomate

el personal del INTA-IFFIVE Córdoba en especial a Liliana di Feo, Raquel Haelterman, Eva Cafrune, Andrea Ribotta, Alicia Córdoba, Karina Grunberg que siempre me ofrecieron su afecto y apoyo

Pilar Castellano que me brindó su ayuda y su amistad y al Ing. Elvio Biderbost que siempre estuvo dispuesto a contribuir en lo que fuera necesario

Olga Del Longo que prestó generosamente su tiempo y sus palabras de aliento

David y Rosa que cuidaron a Julián tantos fines de semana en el Instituto

Susana Díaz, Aníbal y Roberto Arrighetti que estuvieron con Julián en Córdoba y Villa Lugano, armaron y trasladaron cosas de aquí para allá y sobretodo tenían muchas ganas de que me fuera bien

mi mamá y mis hermanos a quienes quiero mucho y sé que me quieren

Norberto Angel que siempre confió en mí y me dio la oportunidad de desarrollar mi profesión en un área que me apasiona y me hace sentir útil

los que no creyeron en mí y así me dieron fuerza para seguir adelante

Edith Taleisnik que dirigió, midió, corrigió, cocinó. albergó, aconsejó, a quien quiero entrañablemente, con quien hemos sobretodo aprendido a tolerarnos y respetarnos

A Julián Arrighetti el
solcito que me dio ganas
de seguir siempre
adelante con esta tesis y
con todo

RESUMEN

La “peste negra del tomate”, causada entre otros, por el tospovirus TSWV, es la principal enfermedad de origen viral, que afecta a esta especie en el cinturón hortícola metropolitano. La exposición del cultivo a altas temperaturas en la etapa de plantín, podría incrementar su predisposición al patógeno. El objetivo de este trabajo, fue describir los cambios en la susceptibilidad del hospedante frente a infecciones de TSWV en respuesta a la aplicación de estrés térmico antes de la inoculación, evaluar la respuesta a tratamientos químicos con potencialidad para modificar tal susceptibilidad, como el ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno (PER) y obtener información sobre algunos mecanismos fisiológicos implicados en estas respuestas, específicamente la actividad de enzimas del sistema antioxidante como catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Plantas jóvenes de tomate fueron sometidas a estrés térmico (24 hs a 40 °C) antes de ser inoculadas con una cepa de TSWV, se evaluó posteriormente la evolución de síntomas bajo condiciones controladas (25 °C, 16 hs de luz). El estrés térmico aplicado, aumentó la predisposición a contraer la virosis en plantas de tomate de tres cultivares susceptibles y uno resistente al patógeno. Este efecto duró hasta 4 horas en el híbrido susceptible Bonanza y una en el resistente Gol. La aplicación de AS y PER en el híbrido susceptible produjo atenuación de síntomas sistémicos y disminución de la sistematización del virus. En el híbrido resistente el AS, atenuó el aumento en el número y tamaño de lesiones locales y disminuyó la sistematización del virus, ambos efectos ocasionados por el estrés térmico. En condiciones de inóculo natural, los tratamientos con AS redujeron el porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra” en el híbrido susceptible. Los períodos de 1 a 4 horas posteriores a la aplicación de estrés térmico coincidió con aumentos en la actividad CAT. Los tratamientos de estrés térmico aplicados, lograrían modificar el estado redox en las células del hospedante y provocarían cambios en su sistema antioxidante para protegerse del estrés oxidativo causado por las altas temperaturas, estos cambios (mayor actividad CAT) provocarían aumentos de predisposición al patógeno. Las prácticas culturales que impliquen someter a las plantas a altas temperaturas, aumentarán la susceptibilidad a TSWV. Aplicaciones exógenas de AS ayudarán a reducir la incidencia de esta enfermedad.

PALABRAS CLAVE: TOMATE TSWV ESTRÉS TÉRMICO ACIDO SALICÍLICO ANTIOXIDANTES

ABSTRACT

Tomato spotted wilt, caused by TSWV among other tospovirus, is the main viral disease affecting tomato crop in Gran Buenos Aires green belt. High temperature exposure of young plants could predispose them to the pathogen. The objective of this work was to describe changes of host susceptibility to infections of TSWV as a consequence of heat shock application prior to inoculation, to evaluate the effect of chemicals which can modify such susceptibility as salicylic acid (SA) and hydrogen peroxide (PER) and to obtain information about some physiological mechanisms involved in the response to such conditions, specifically the activity of some antioxidant enzymes like catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Heat shock (24 hs at 40 °C) was applied to young tomato plants prior to be mechanically inoculated with a TSWV strain, symptoms evolution were evaluated during the following 15 days under controlled conditions (25 °C, 16 hs photoperiod). Young plants of three susceptible cultivars and a resistant one, which suffered heat shock prior to inoculation showed more predisposition to viral infection. SA and PER application in the susceptible cv caused lower systemic symptoms severity and viral distribution. Inoculated leaves of the resistant cv treated with SA showed less number and diameter of local lesions and reduced viral distribution to apical leaf, both effects observed after heat shock application. SA applications reduced the incidence of plants showing symptoms of tomato spotted wilt in the susceptible cultivar under natural inoculum conditions during four seasons. Periods of 1- 4 hours after heat shock during which predisposing effect of high temperatures were observed, showed higher CAT activity. Heat shock could modify host cell redox status and cause changes in antioxidant system in order to protect themselves from oxidative burst caused by high temperatures, these changes (higher CAT activity), could predispose host to the pathogen infection. Cultural practices which imply exposure of plants to high temperatures can increase tomato young plants susceptibility to TSWV. Exogen applications of SA at the assayed dosis will reduce disease incidence.

KEY WORDS: TOMATO TSWV HEAT SHOCK SALICYLIC ACID ANTIOXIDANTS

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| Capítulo 1. | 2 |
| Importancia del problema | 2 |
| Antecedentes generales | 4 |
| Cambios fisiológicos ocasionados por el estrés térmico en plantas | 4 |
| Rol del ácido salicílico en la respuesta de la planta frente al estrés abiótico | 5 |
| Rol del ácido salicílico en la respuesta de la planta frente a patógenos | 8 |
| Rol de las especies activas de oxígeno y el sistema antioxidante en la célula vegetal | 9 |
| Rol de las especies activas de oxígeno y el sistema antioxidante en la respuesta de la célula vegetal frente al estrés | 10 |
| Rol de las especies activas de oxígeno y el sistema antioxidante en el establecimiento de relaciones compatibles e incompatibles entre patógenos y plantas | 11 |
| Cambios en el hospedante ocasionados por el estrés térmico que afectan el proceso de infección viral | 14 |
| Hipótesis | 19 |
| Objetivos | 20 |
| Capítulo 2. Efecto del estrés térmico sobre la expresión de síntoma de “peste negra”, el crecimiento y parámetros productivos en genotipos de tomate susceptibles y resistentes a TSWV | 22 |
| Introducción | 22 |
| Hipótesis | 27 |
| Objetivos | 27 |
| Materiales y métodos | 28 |
| Materiales genéticos utilizados | 28 |
| Obtención de plantines | 28 |
| Preparación del inóculo | 28 |
| Aplicación de los tratamientos de estrés térmico | 29 |
| Determinación del contenido relativo de agua | 29 |
| Variables de respuesta | 30 |
| Incidencia e intensidad de la enfermedad | 30 |
| Progreso de la enfermedad | 31 |
| Pruebas de diagnóstico | 31 |
| Evaluación del crecimiento | 31 |
| Evaluación de parámetros productivos | 31 |
| Diseño estadístico y procesamiento de datos | 32 |
| Resultados | 36 |
| Efecto de los tratamientos de estrés sobre la temperatura de hoja y el contenido relativo de agua en los híbridos resistente y susceptible a TSWV | 36 |
| Efecto del estrés térmico sobre el crecimiento en los híbridos resistente y susceptible a TSWV | 38 |
| Efecto del estrés térmico sobre la expresión de síntomas en los híbridos resistente y susceptible a TSWV | 40 |

| | |
|--|----|
| Efecto del estrés térmico y la inoculación con TSWV sobre parámetros productivos en el híbrido susceptible a TSWV | 42 |
| Determinación de las horas de estrés térmico necesarias para modificar la predisposición a TSWV en los híbridos resistente y susceptible a TSWV | 44 |
| Duración del efecto del estrés térmico sobre predisposición a TSWV en los híbridos resistente y susceptible | 47 |
| Discusión | 49 |
| Efecto del estrés térmico sobre el crecimiento y parámetros productivos en los híbridos resistente y susceptible a TSWV | 49 |
| Efecto del estrés térmico sobre la expresión de síntomas de TSWV | 50 |
| a) en una interacción planta patógeno compatible | 50 |
| b) en una interacción planta patógeno incompatible | 51 |
| Conclusiones parciales | 55 |
| Capítulo 3. Efecto del ácido salicílico sobre la predisposición a la infección con TSWV y sobre el crecimiento y parámetros productivos en plantas de tomate resistentes y susceptibles al virus bajo condiciones controladas y bajo presión de inóculo natural | 57 |
| Introducción | 57 |
| Efecto de las altas temperaturas sobre la acumulación de ácido salicílico y la respuesta de la planta frente a patógenos | 60 |
| El uso de inductores de resistencia en agricultura | 61 |
| Hipótesis | 64 |
| Objetivos | 64 |
| Materiales y métodos | 65 |
| Materiales genéticos utilizados | 65 |
| Obtención de plantines, preparación del inóculo y aplicación de los tratamientos de estrés | 65 |
| Tratamientos con ácido salicílico | 65 |
| Variables de respuesta | 65 |
| Evaluación de la enfermedad, progreso de la enfermedad, pruebas de diagnóstico y evaluación de parámetros productivos | |
| Evaluaciones a campo bajo condiciones de inóculo natural | 66 |
| Evaluación del desarrollo de organismos del filoplano, patógenos foliares y radiculares | 67 |
| Diseño estadístico y procesamiento de datos | 67 |
| Resultados | 70 |
| Modificación de la predisposición frente a TSWV por aplicaciones exógenas de ácido salicílico, efecto sobre el crecimiento y parámetros productivos | 70 |
| A) Híbrido susceptible Bonanza | 70 |
| B) Híbrido resistente Gol | 73 |
| Respuesta al estrés térmico y aplicaciones con ácido salicílico en un genotipo deficiente en producción de ácido salicílico | 76 |
| Efecto de aplicaciones de ácido salicílico sobre el crecimiento, parámetros productivos y la manifestación de síntomas TSWV bajo condiciones de inóculo natural | 78 |
| A) En plantas no sometidas a estrés térmico antes del trasplante | 78 |
| B) En plantas sometidas a estrés térmico antes del trasplante | 80 |
| Discusión | 82 |

| | |
|---|-----|
| Efectos de la aplicación de AS sobre la expresión de síntomas de TSWV en una interacción planta patógeno compatible | 82 |
| Efectos de la aplicación de AS sobre la expresión de síntomas de TSWV en una interacción planta patógeno incompatible | 83 |
| Respuesta al estrés térmico y aplicaciones con ácido salicílico sobre la expresión de síntomas de TSWV en un genotipo deficiente en producción de ácido salicílico | 84 |
| Efecto del ácido salicílico sobre parámetros productivos | 85 |
| Conclusiones parciales | 90 |
| Capítulo 4. Relación entre el peróxido de hidrógeno y la actividad de enzimas antioxidantes con el incremento en predisposición a TSWV causada por la exposición a altas temperaturas | 92 |
| Antecedentes | 92 |
| Rol de las especies activas de oxígeno y el sistema antioxidante en el establecimiento de relaciones compatibles e incompatibles entre patógenos y plantas | 92 |
| A) En interacciones planta patógeno incompatibles | 94 |
| B) En interacciones planta patógeno compatibles | 96 |
| Relación entre el incremento en predisposición a enfermedades virales causada por la exposición a altas temperaturas, los cambios en acumulación de especies activas de oxígeno y la expresión del sistema antioxidante | 99 |
| Hipótesis | 102 |
| Objetivos | 102 |
| Materiales y métodos | 103 |
| Materiales genéticos utilizados | 103 |
| Procedimientos comunes a todos los experimentos | 103 |
| Obtención de plantines, preparación del inóculo, aplicación de los tratamientos de estrés | |
| Tratamientos con peróxido de hidrógeno | 103 |
| Variables de respuesta | 103 |
| Evaluación de la enfermedad, progreso de la enfermedad, pruebas de diagnóstico | |
| Actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa | 103 |
| Diseño estadístico y procesamiento de datos | 104 |
| Resultados | 105 |
| Modificación del efecto predisponente del estrés térmico por aplicaciones exógenas de peróxido de hidrógeno | 105 |
| A) Híbrido susceptible a TSWV Bonanza | 105 |
| B) Híbrido resistente a TSWV Gol | 108 |
| C) Mutante para NADPH oxidasa y el silvestre (Motelle) | 109 |
| Efecto de los tratamientos de estrés térmico sobre la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en hojas de cultivares de tomate resistentes y susceptibles antes de la inoculación. | 111 |
| Discusión | 112 |
| Modificación del efecto predisponente del estrés térmico por aplicaciones exógenas de peróxido de hidrógeno | 112 |
| A) En una interacción planta patógeno compatible | 112 |
| B) En el mutante para NADPH oxidasa y el silvestre Motelle | 113 |
| C) En una interacción planta patógeno incompatible | 114 |

| | |
|--|-----|
| Efectos de los tratamientos de estrés térmico sobre la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en hojas de cultivares de tomate resistentes y susceptibles. | 116 |
| Conclusiones parciales | 118 |
| Capítulo 5. Discusión y conclusiones generales | 119 |
| Conclusiones generales | 134 |
| Recomendaciones | 135 |
| Futuras líneas de investigación | 135 |
| Bibliografía | 136 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 2.1 Altura (cm) a los 15 días de la inoculación, materia seca total por planta (g/planta) y tasa relativa de crecimiento (cm/día)/altura final). Híbrido Bonanza, susceptible a TSWV. | 38 |
| Tabla 2.2 Altura (cm) a los 15 días de la inoculación, materia seca total por planta (g/planta) y tasa relativa de crecimiento (cm/día)/altura final). Híbrido Gol resistente a TSWV. | 39 |
| Tabla 2.3 Resultados del test de ELISA para TSWV (A_{410}) en el folíolo inoculado y folíolo apical de plantas del híbrido Bonanza, a diversos tiempos desde la inoculación. | 40 |
| Tabla 2.4 Resultados del test de ELISA para TSWV (A_{410}) en el folíolo inoculado del híbrido Gol. | 41 |
| Tabla 3.1 Precipitaciones acumuladas (mm) y promedio de las temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) medias en abrigo, 60 días antes y después de cada transplante de las evaluaciones a campo bajo condiciones de inóculo natural. | 66 |
| Tabla 3.2 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Número de agallas/g raíz, porcentaje de raíces con síntomas de podredumbres radiculares y materia seca raíz. | 80 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 Esquema del sistema experimental desarrollado | 33 |
| Figura 2.2 Evaluación de síntomas de TSWV | 34 |
| Figura 2.3 Evaluación de parámetros productivos | 35 |

| | |
|--|----|
| Figura 2.4 Temperatura de hoja a una hora (IE), a 18 y 22 horas de iniciado el estrés (DIE), al momento de inocular (INOC) y 18 horas después de inocular. | 36 |
| Figura 2.5 Contenido relativo de agua después de finalizado el tratamiento de estrés (24 horas a 40 °C) para los híbridos Gol y Bonanza. | 37 |
| Figura 2.6 Severidad de síntomas sistémicos y días hasta aparición de síntomas en plantas sometidas a estrés antes de la inoculación y control. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 40 |
| Figura 2.7 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Lesiones locales por folíolo inoculado a distintos días de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 41 |
| Figura 2.8 Rendimiento y descarte total, causas de descarte y categorías de fruto comercial para plantas inoculadas con y sin estrés antes de la inoculación. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 42 |
| Figura 2.9 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Híbrido Bonanza, susceptible a TSWV. | 44 |
| Figura 2.10 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 46 |
| Figura 2.11 Duración del efecto del estrés térmico. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 47 |
| Figura 2.12 Duración del efecto del estrés térmico. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 48 |
| Figura 3.1 Evaluación del efecto de aplicaciones de ácido salicílico bajo presión de inóculo natural. | 69 |
| Figura 3.2 Efecto del estrés térmico y la aplicación de ácido salicílico antes de la inoculación. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 70 |
| Figura 3.3 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Rendimiento total (kg/planta), rendimiento comercial (kg/planta) y causas de descarte para plantas sanas e inoculadas. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 72 |
| Figura 3.4 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Híbrido Gol susceptible a TSWV. | 73 |
| Figura 3.5 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Test de ELISA en folíolo inoculado y apical. Híbrido Gol susceptible a TSWV. | 74 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3.6 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Rendimiento total (kg/planta), rendimiento comercial (kg/planta) y causas de descarte para plantas sanas e inoculadas. Híbrido Gol susceptible a TSWV. | 75 |
| Figura 3.7 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico y efecto del ácido salicílico. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad. Silvestre Moneymaker y mutante portador del gen NahG que transforma el ácido salicílico en catecol. | 76 |
| Figura 3.8 Folíolos inoculados ELISA positivos 5 días después de la inoculación. Silvestre Moneymaker y mutante NahG deficiente en ácido salicílico. | 77 |
| Figura 3.9 Folíolos apicales ELISA positivos 5 días después de la inoculación. Silvestre Moneymaker y mutante NahG deficiente en ácido salicílico. | 77 |
| Figura 3.10 Efecto de aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Plantas con síntomas de "peste negra" al final del ciclo de cultivo bajo condiciones de inóculo natural, campañas 1999, 2000, 2004 y 2005. A Híbrido susceptible y B resistente a TSWV | 78 |
| Figura 3.11 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Rendimiento total y comercial (kg/m ²), para el híbrido susceptible Bonanza y resistente Gol para tres campañas de cultivo en invernadero. | 79 |
| Figura 3.12 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Descarte por virósico para tres campañas de cultivo en invernadero. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV | 79 |
| Figura 3.13 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural en plantas sometidas al estrés térmico antes del trasplante. Rendimiento total y comercial (kg/m ²), para el híbrido susceptible Bonanza y resistente Gol en invernadero | 81 |
| Figura 4.1 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico en plantas con y sin aplicación exógena de H ₂ O ₂ . Area bajo la curva de progreso de la enfermedad. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 105 |
| Figura 4.2 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico en plantas con y sin aplicación exógena de H ₂ O ₂ . Porcentaje de folíolos ELISA positivos. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 106 |
| Figura 4.3 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Híbrido Gol resistente a TSWV. Número y diámetro de lesiones locales en el folíolo inoculado, 15 días después de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 108 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.4 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico en el silvestre Motelle y en su mutante deficiente en la enzima NADPH Variable: área bajo la curva de progreso de la enfermedad. | 109 |
| Figura 4.5 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Folíolos inoculados ELISA positivos 5 días después de la inoculación en el silvestre Motelle y en su mutante deficiente en la enzima NADPH. | 110 |
| Figura 4.6 Actividad CAT (mmol H ₂ O ₂ /min mg prot) y SOD (USOD/mg prot) antes de inocular y después de los tratamientos de estrés. | 111 |
| Figura 1. Discusión general | 122 |

ANEXO I

| | |
|---|-----|
| Tabla 2.1 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para altura (cm) a los 15 días de la inoculación, materia seca total por planta (g/planta) y tasa relativa de crecimiento (cm/día)/altura final). Híbrido Bonanza, susceptible a TSWV. | 150 |
| Tabla 2.2 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para severidad de síntomas a inicios y fin de la evaluación y días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Híbrido Bonanza, susceptible a TSWV. | 151 |
| Tabla 2.3 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para test de ELISA (Absorción a 410 nm) al folíolo inoculado y folíolo apical. Repeticiones 2 y 3. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV | 151 |
| Tabla 2.4 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para rendimiento total (kg/planta), descarte total (%), causas de descarte (%) y porcentaje de frutos comerciales chico, mediano y grande. Híbrido Bonanza, susceptible a TSWV. | 152 |
| Tabla 2.5 Análisis de variancia para altura (cm) a los 15 días de la inoculación, materia seca total por planta (g/planta) y tasa relativa de crecimiento (cm/día)/altura final). Híbrido Gol resistente a TSWV. | 153 |
| Tabla 2.6 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para número de lesiones locales en el folíolo inoculado a inicios y fin de la evaluación y número de folíolos inoculados muertos. Híbrido Gol, resistente a TSWV. | 153 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 2.7 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para absorción a 410 nm correspondiente al test de ELISA en el folíolo inoculado y folíolo apical. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 154 |
| Tabla 2.8.1 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para severidad de síntomas sistémicos a inicios y fin de la evaluación y días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas para las repeticiones 1, 2 y 3. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 154 |
| Tabla 2.8.2 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia por repetición para severidad de síntomas a los 5 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 155 |
| Tabla 2.9.1 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para número y diámetro de lesiones locales a inicios y fin de la evaluación, días hasta aparición de lesiones y porcentaje de folíolos inoculados con lesiones. Repetición 1. Híbrido Gol resistente a TSWV | 155 |
| Tabla 2.9.2 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para número y diámetro de lesiones locales a inicios y fin de la evaluación, días hasta aparición de lesiones y porcentaje de folíolos inoculados con lesiones. Repetición 2. Híbrido Gol resistente a TSWV | 156 |
| Tabla 2.10 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis para test de ELISA (Absorción a 410 nm) para folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación y folíolo apical a los 5 y 10 días de la inoculación. Repeticiones 1 y 2. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 156 |
| Tabla 2.11 Duración del efecto del estrés térmico. Análisis para severidad de síntomas a los 13 y 6 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas, repeticiones 1 y 2. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 157 |
| Tabla 2.12.1 Duración del efecto del estrés térmico. Análisis de variancia para número y diámetro de lesiones locales a inicios y fin de la evaluación, días hasta aparición de lesiones y porcentaje de folíolos inoculados con lesiones. Rep 1. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 157 |
| Tabla 2.12.2 Duración del efecto del estrés térmico. Análisis de variancia para número y diámetro de lesiones locales a inicios y fin de la evaluación, días hasta aparición de lesiones y porcentaje de folíolos inoculados con lesiones. Rep 2. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 158 |
| Tabla 3.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para severidad de síntomas a 6 y 7 días de | 159 |

la inoculación (S 6 y S 7), área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AREA), días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas (DAS). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| | |
|---|-----|
| Tabla 3.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Porcentaje de folíolos apicales ELISA + a los 15 días de la inoculación. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 159 |
| Tabla 3.3.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento total (g/planta), porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, podredumbre apical, virósico y descarte total. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repetición 1. | 160 |
| Tabla 3.3.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento total (g/planta), porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, virósico y descarte total. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repetición 2. | 160 |
| Tabla 3.4.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (g/planta), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repetición 1. | 161 |
| Tabla 3.4.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (g/planta), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repetición 2. | 161 |
| Tabla 3.5.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para número (L 5 y L 11) y diámetro de lesiones locales (D 5 y D 11) a inicios y fin de la evaluación (5 y 11 días de la inoculación respectivamente). Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 1. | 162 |
| Tabla 3.5.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación ANOVA para número (LES 5 y LES 15) y diámetro de lesiones locales (DIAM 5 Y DIAM 15) a inicios y fin de la evaluación (5 y 15 días de la inoculación respectivamente). Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 2. | 162 |
| Tabla 3.6 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV. Análisis de variancia para test de ELISA (Absorción a 410 nm) para folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación (INOC5) y folíolo apical a los 5 (API5) y 10 (API10) días de la inoculación. | 163 |
| Tabla 3.7.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento total (g/planta), porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, podredumbre apical, virósico y descarte total. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 1. | 163 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 3.7.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento total (g/planta), porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme y descarte total. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 2. | 164 |
| Tabla 3.8.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (g/planta), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 1. | 164 |
| Tabla 3.8.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Gol resistente a TSWV. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (g/planta), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 2. | 165 |
| Tabla 3.9.1 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra” al final del cultivo en invernadero bajo condiciones de inóculo natural. | 165 |
| Tabla 3.9.2 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para porcentaje de plantas ELISA + para TSWV y TCSV/GRSV a los 60 días del transplante. | 166 |
| Tabla 3.10 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables rendimiento total porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, podredumbre apical, virósico, polilla del tomate y descarte total. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 166 |
| Tabla 3.11 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (kg/m ²), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. | 167 |
| Tabla 3.12 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables rendimiento total porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, polilla del tomate y descarte total. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 167 |
| Tabla 3.13 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (kg/m ²), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Gol resistente a TSWV. | 168 |
| Tabla 3.14 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables número de agallas/g raíz, porcentaje de raíces con síntomas de podredumbres radiculares y materia seca raíz. | 168 |
| Tabla 3.15 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural | 169 |

en plantas sometidas al estrés térmico antes del trasplante. Análisis de variancia para las variables rendimiento total y comercial (kg/m²) y porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra”. Híbridos Bonanza y Gol.

| | |
|--|-----|
| Tabla 3.16. Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) y efecto del ácido salicílico. Análisis de variancia para severidad de síntomas a los 16, 21 y 28 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas, Silvestre Money Maker. | 169 |
| Tabla 3.17 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) y efecto del ácido salicílico. Análisis de variancia para severidad de síntomas a los 14, 26 y 39 días de la inoculación , área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas , Mutante NahG. | 170 |
| Tabla 4.1 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para Severidad de síntomas a los 13, 11 y 9 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV, repeticiones 1, 2 y 3. | 171 |
| Tabla 4.2 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para porcentaje de folíolos inoculados (INOC 5) y apicales 5 (API 5) y 15 (API 15) días después de la inoculación. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repeticiones 1, 2 y 3. | 172 |
| Tabla 4.3.1 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para número de lesiones a los 5 y 15 días de la inoculación, días desde la inoculación hasta la aparición de lesiones locales. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 173 |
| Tabla 4.3.2 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para diámetro de lesiones a los 5, 10 y 15 días de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV. | 174 |
| Tabla 4.4 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para severidad de síntomas a los 13, 20 y 36 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Silvestre Motelle. | 175 |
| Tabla 4.5 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico | 176 |

(40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para severidad de síntomas a los 10, 20 y 30 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Mutante NADPH oxidasa.

Tabla 4.6 Análisis de variancia para actividad SOD (USOD/mg prot) y CAT (mmol H₂O₂/min prot) para una repetición del híbrido susceptible a TSWV (BONANZA) y dos del resistente (GOL 1 y GOL 2). Muestras extraída después de los tratamientos de estrés y antes de inocular.

177

LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SIMBOLOS

| | |
|-------------------------------|--|
| AB | Acido abscícico |
| ABA | L - α - amino butyrico |
| ABM | Ácido benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothioico S-methyl ester |
| ADN | Acido desoxiribonucleico |
| AG | Acido giberélico |
| APX | Ascorbato peroxidasa |
| ARN | Acido ribonucleico |
| AS | Acido salicílico |
| °C | Grados centígrados |
| CA-POX | Coniferyl alcohol peroxidasa |
| CAT | Catalasa |
| Cv | Cultivar |
| CV | Coeficiente de variación |
| DHAR | Dehidroascorbato reductasa |
| EAO | Especies activas del oxígeno |
| FV | Fuente de variación |
| GPX | Glutation peroxidasa |
| GR | Glutation reductasa |
| GST | Glutation S-transferasa |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |

| | |
|-----------------------------|---|
| MDHAR | Monodehidroascorbato reductasa |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| O ₂ ⁻ | Anión superóxido |
| ON | Oxido nítrico |
| POX | Guaiacol-peroxidasa |
| PPO | Polifenol oxidasa |
| PX | Peroxidasa |
| PR | Proteína relacionada con la patogénesis |
| R ² | Coefficiente de determinación |
| RH | Respuesta hipersensible |
| RSA | Resistencia sistémica adquirida |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| UV | Ultra violeta |
| HO* | radical oxidrilo |
| <i>Hsp</i> | Heat shock protein |
| INA | Ácido 2,6-dicloro-isonicotínico |
| MCP | Muerte celular programada |
| Mm | Mili molar |
| Mm | milímetros |
| Min mg prot | Minuto miligramo proteína |
| HCL | Acido clorhídrico |

CAPÍTULO 1

IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

La tecnología del cultivo bajo cubierta apunta a maximizar los rendimientos, mediante un preciso control del ambiente, riego y nutrición (Jarvis, 1992). Para cubrir necesidades del mercado, las especies hortícolas son cultivadas en momentos del año en que no se registran las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo, originándose naturalmente condiciones de estrés. En nuestro país son frecuentes estas situaciones en invernaderos, causadas por problemas de dimensiones inadecuadas (suelen ser de menor altura que lo recomendable) y ventilación insuficiente. En el caso específico del tomate, los ciclos de producción bajo cubierta en el cinturón hortícola que rodea a la Capital Federal y en otras localidades de la provincia de Bs. As., Santa Fe y Entre Ríos son dos: uno de primicia que implica sembrar los plantines a partir de mediados de junio, para transplantar en agosto y otro de tardicia, para lo cual siembras y trasplantes se realizan entre noviembre y principios de enero. En el primer caso los plantines son producidos en momentos donde la temperatura y la luminosidad, se encuentran por debajo del óptimo requerido para la especie, en los meses de diciembre y enero por el contrario, éstas superan, por lo menos en varias horas del día, estos niveles (Francescangeli y Mitidieri, 1996; Logegaray *et al.*, 2007). Estas condiciones ambientales estresantes en la etapa de producción del plantín y en el momento del trasplante, tienen consecuencias directas, no sólo sobre parámetros productivos, sino sobre la predisposición a plagas y patógenos de diversa índole (Schoeneweiss, 1975).

De los problemas de índole productiva, detectados en el diagnóstico realizado por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), en el cinturón hortícola que rodea a Capital Federal y al Gran Buenos Aires, los de orden sanitario se destacan como prioritarios (INTA, 2005, 2008). Entre las enfermedades de origen viral, la “peste negra del tomate” es la más importante. Esta enfermedad es causada por un grupo de virus del género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*, de los cuales en la Argentina se han identificado

tres: “tomato spotted wilt virus” (TSWV), “groundnut ring spot virus” (GRSV) y “tomato chlorotic spot virus” (TCSV)(Dewey *et al.*, 1996; Gracia, 1996; Dal Bó, E., 1996 ; Williams *et al.*, 1997).

TSWV afecta a más de 900 especies (Cho *et al.*, 1986; Cho *et al.*, 1987; Peters, *et al.*, 1991; Ullman *et al.*, 2002). Entre los años 1996 y 1997 se realizó una prospección fitopatológica para detectar la distribución de los diferentes tospovirus en las zonas de producción de tomate de Argentina. De 420 muestras de plantas con síntomas de “peste negra”, 170 resultaron ELISA positivos, de éstos 63 % fueron identificados como GRSV, 28.2 % como TCSV y 8.8 % como TSWV. Las plantas infectadas con GRSV provenían del centro y noroeste, las infectadas con TCSV del noreste y litoral; TSWV fue encontrado solamente en el Valle de Río Negro (Williams *et al.*, 2001). Recientemente Calvo *et al.* (2008), registraron en la zona de La Plata la presencia de TSWV en plantas de pimiento con síntomas de “peste negra”. En la naturaleza, los tospovirus son transmitidos exclusivamente por insectos del orden Thysanoptera y de una manera persistente. En Argentina se ha citado la presencia de tres de las especies vectoras, *Frankliniella schultzei*, (Trybom), *Thrips tabaci* (Linderman), ambas registradas desde 1935 y *Frankliniella occidentalis* (Pergande), (Williams *et al.*, 1997), esta última es más eficiente en la transmisión del virus (Inoue *et al.*, 2004).

A partir de los años 1994/95 en que se registraron pérdidas importantes debido a esta virosis (El Informe Frutihortícola, 1996), el productor hortícola, tuvo a su alcance distintos medios para manejar la enfermedad. Entre los principales se encuentran la aparición en el mercado de híbridos de tomate y pimiento resistentes a la virosis, el uso de mallas antiinsectos y el conocimiento de principios activos eficaces para controlar trips, así como de los momentos críticos en que se deben realizar los controles (Mitidieri *et al.*, 1996 a y b). En las campañas 2000 a 2002 se registraron condiciones climáticas caracterizadas por abundantes precipitaciones en la provincia de Bs. As., estas condiciones fueron poco propicias para la población de vectores y redujeron la importancia de la enfermedad, aunque ésta siempre estuvo presente en lotes de productores que no podían acceder a la tecnología apropiada para su control (uso de insecticidas, híbridos resistentes, saneamiento), llegando a porcentajes de incidencia del 30 %, en algunos casos (Mitidieri,

2000). En las campañas 2003/04 y 2008/2009, se volvieron a presentar condiciones ambientales de escasas precipitaciones y una incidencia alta del "virus de la peste negra" (10-20 % o superiores) en lotes comerciales (Mitidieri, 2003; Grupo Ghia, 2009). Últimamente se han detectado quiebres de la resistencia genética en distintos países productores de hortalizas, en el caso del pimiento estos problemas son más acentuados, obligando al productor a controlar el vector, de la misma manera que lo hace cuando cultiva un material susceptible (Picó, 2002; Roggero *et al.*, 2002; Margaria, 2004). En nuestro país este fenómeno también ha sido detectado, el principal tospovirus aislado de plantas de pimiento resistentes a "peste negra" y manifestando síntomas de esta enfermedad ha sido TSWV (Calvo *et al.*, 2008).

Numerosos trabajos demuestran que la manifestación sintomática que caracteriza a la "peste negra", está influida por la temperatura, la luminosidad, el estado vegetativo y fenológico de la planta, su equilibrio hídrico y nutricional, la edad del hospedante, etc. (Kassanis, 1952; Yarwood, 1958; Bawden y Roberts, 1947, 1948; Yarwood, 1976; Goodman *et al.*, 1986; Paterson *et al.*, 1989; Córdoba *et al.*, 1991; Kaminska, 1993; De Angelis *et al.*, 1994; Jordá *et al.*, 1996; Lacasa *et al.*, 1997). Es importante, por lo tanto, conocer cómo las variables ambientales, afectan las características morfofisiológicas del plantín, su predisposición a las enfermedades y el efecto de estos factores en la producción (Mancini, 1991; Minami, 1995).

ANTECEDENTES GENERALES

CAMBIOS FISIOLÓGICOS OCASIONADOS POR EL ESTRÉS TÉRMICO EN PLANTAS

El estrés térmico provoca alteraciones en el metabolismo, con consecuencias sobre un gran número de funciones. Se conoce, por ejemplo, que a altas temperaturas la tasa fotosintética decae antes que la respiratoria, por lo tanto esto ocasiona una disminución en las reservas de carbohidratos (Paolacci *et al.*, 1997; Taiz y Zeiger, 1998; Rizhsky, 2002). La exposición a altas temperaturas, también puede afectar la estabilidad de las membranas celulares, conduciendo a alteraciones en su selectividad y a la pérdida de iones, efectos que

inciden en casi todas las funciones celulares (Blum, 1988; Cronjé y Bornman, 1999). Otro efecto negativo de la exposición de las células al estrés térmico es la desnaturalización y disfunción de muchas proteínas (Vinocur y Altaman, 2005). En cuanto a las hormonas vegetales, las altas temperaturas estimulan la síntesis de ácido abscísico y reducen la de citocininas; estas últimas relacionadas con la actividad fotosintética, la producción de clorofila y el desarrollo de los cloroplastos (Nilson y Orcutt, 1996).

Además de estos cambios, las células bajo estrés térmico reaccionan liberando especies activas del oxígeno (EAOs) (Dat *et al.*, 1998; Edreva, 2005). Una de las funciones fisiológicas alteradas por efecto de las altas temperaturas, es la transferencia de electrones en la mitocondria, los electrones del NADH producido por las enzimas del ciclo de Krebs son conducidos a la reducción de oxígeno y generación de EAOs (Rizhsky, 2002). Este tipo de estrés activa también la síntesis de proteínas como las de choque térmico (Ding *et al.*, 2001), que tienen la función de preservar la maquinaria celular de los efectos nocivos del estrés (Taiz y Zeiger, 1998).

Otro cambio observado en plantas sometidas a altas temperaturas, es la activación de enzimas antioxidantes; en tomate, por ejemplo, plantas sometidas a 35 °C mostraron mayor concentración de H₂O₂ y expresión de la enzima superóxido dismutasa férrica en hojas comparado con un control mantenido a 25 °C, así como menor expresión de la enzima catalasa (Rivero *et al.*, 2003).

ROL DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA RESPUESTA DE LA PLANTA FRENTE AL ESTRÉS ABIÓTICO

El ácido salicílico (AS), es considerado actualmente un regulador endógeno de acción hormonal (Szepesi *et al.*, 2005), que controla el crecimiento y el desarrollo (Schettel y Balke, 1983), la tasa fotosintética y respiratoria (Pancheva *et al.*, 1996), el transporte de iones (Harper y Balke, 1981) e induce cambios en la anatomía foliar y ultraestructura de los cloroplastos (Uzunova y Popova, 2000); se acumula durante la exposición a ozono y

luz UV (Yalpani *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1996) e interviene en la respuesta a estrés de origen abiótico como estrés salino y osmótico (Borsani *et al.*, 2001).

Otros efectos observados del AS sobre las plantas, son la inducción de termotolerancia, y la inducción de la activación del sistema antioxidante (Dat *et al.*, 1998). En tabaco, bajas concentraciones de ácido salicílico (10 $\mu\text{mol/l}$) indujeron termotolerancia mientras que altas concentraciones (100 $\mu\text{mol/l}$) no lograron este efecto; a medida que aumentó el nivel de AS, aumentó la concentración de H_2O_2 y disminuyó la actividad catalasa. Altas y bajas concentraciones de AS aumentaron las actividades de glutatión reductasa y dehidroascorbato reductasa (Dat *et al.*, 2000). En maíz se logró incrementar la resistencia al frío con el agregado de AS (Janda *et al.*, 2005), en coincidencia con aumentos en la actividad de peroxidasa y glutatión reductasa y disminuciones en la de catalasa (Horvath *et al.*, 2002). Wang y Li, (2005), lograron aumentar la tolerancia de hojas de vid a altas y bajas temperaturas, mediante la aplicación exógena de ácido salicílico. A la vez, como consecuencia de estos tratamientos, se observaron mayores actividades relativas de ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), monodehidroascorbato y la relación redox ascorbato-glutatión.

Senaratna *et al.*, (2000) encontraron que la imbibición de semillas de poroto y tomate en soluciones acuosas de ácido salicílico y acetyl salicílico (0.1-0.5 mM) indujo tolerancia al calor, frío y sequía, mientras que la aplicación de una dosis 1 mM produjo daños a los tejidos. Popova *et al.*, (2003), trataron plantines de cebada con AS 0.5 mM y observaron que éste preservaba a la fotosíntesis del estrés oxidativo causado por la aplicación de paraquat, el AS mejoró la capacidad de defensa del sistema antioxidativo. Szepesi *et al.*, (2005), encontraron que pretratamientos con AS, pueden inducir resistencia a estrés salino (100 mM NaCl), este efecto se asoció a la activación del sistema antioxidante. Las concentraciones altas de AS (10^{-4} M) aumentaron la actividad superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (PX) y glutatión reductasa, mientras que las menores concentraciones (10^{-7} M) disminuyeron la actividad catalasa (CAT), SOD, guaiacol peroxidasa (POX) y ascorbato peroxidasa, el tratamiento con AS disminuyó la actividad CAT en hojas y raíces.

Existe una compleja relación entre la liberación de H_2O_2 , el aumento en la concentración de AS y la inhibición de la enzima catalasa, que cataliza la transformación del primero en O_2^- y H_2O_2 . Rao *et al.*, (1997) estudiaron el aumento en concentración de H_2O_2 en *Arabidopsis thaliana*, luego de la aplicación de AS. Encontraron que el H_2O_2 aumenta su concentración respondiendo a las dosis de AS aplicado. Mitigando la concentración de H_2O_2 con dimetiltiourea, disminuyó el efecto oxidante de AS, demostrando la necesidad de la existencia de peróxido para que actúe el AS. La aplicación de AS 1 mM aumentó la concentración de H_2O_2 59 veces más que el control y produjo daño de membranas y proteínas, aumentó la actividad SOD 32 % más que el control, pero no modificó la actividad catalasa ni ascorbato peroxidasa, aunque dosis mayores sí lo hicieron. La actividad guaiacol-peroxidasa (POX) no aumentó, pero sí la de coniferyl alcohol peroxidasa (CA-POX), la actividad glutatión reductasa no fue modificada a ninguna dosis. Estos autores concluyeron que el AS aumenta los valores de H_2O_2 en hojas activando las enzimas que lo generan, más que inactivando las enzimas que lo degradan.

Fodor *et al.*, (1997) en tabaco observaron inducción de dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa, glutatión S-transferasa (GST) y actividad superóxido dismutasa en las hojas tratadas con AS, pero no en las superiores, no observaron cambios en la actividad CAT. Chen *et al.*, (1997) encontraron que el contenido endógeno de AS es muy diferente en distintos tejidos de la planta de arroz, siendo alto en las raíces y bajo en los brotes y relacionaron estos valores a la presencia en estos tejidos de catalasas con sensibilidad diferencial ante AS.

Kauss y Jeblick (1995), obtuvieron aumentos en la concentración de H_2O_2 después de tratar con AS suspensiones celulares de perejil (*Petroselinum crispum* L.). León *et al.* (1995), encontraron en tabaco, que la infiltración de hojas con H_2O_2 aumentó en 5 veces con respecto al control los niveles de ácido salicílico y ácido benzoico, sugirieron que el H_2O_2 activa la biosíntesis de AS. También en tabaco, Dat *et al.* (2000), observaron que a medida que aumenta el AS, aumenta la concentración de H_2O_2 , disminuye la actividad catalasa y aumenta la actividad reductasa y dehidroascorbato reductasa. Rao *et al.* (1997), observó que las plantas tratadas con H_2O_2 sufrían menos daño oxidativo que las tratadas con AS, pero éste requería peróxido para iniciar el daño oxidativo.

Según los antecedentes disponibles, el ácido salicílico está involucrado en la respuesta de la planta al estrés abiótico, en estrecha relación con cambios en la presencia de H₂O₂ y la actividad de algunas enzimas antioxidantes.

ROL DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA RESPUESTA DE LA PLANTA FRENTE A PATÓGENOS

Además del rol que cumple el AS en la resistencia al estrés de origen abiótico, este compuesto está involucrado en la transmisión de señales de defensa (Ryals *et al.*, 1996; Gaffney *et al.*, 1993) y la resistencia a enfermedades (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Thulke y Conrath, 1998).

La interacción entre plantas potencialmente hospedantes y patógenos puede ser compatible o incompatible. Las interacciones compatibles resultan en la proliferación del patógeno en la planta y en el desarrollo de síntomas sistémicos, mientras que las interacciones incompatibles inducen una respuesta de defensa del hospedante que restringe la sistematización del patógeno.

Existe un aumento en el nivel endógeno de AS luego del ataque de un patógeno, esto correlaciona con la expresión de genes relacionados con la patogénesis. En relación a esta respuesta, se ha observado una proteína que se une a AS, que fue identificada como catalasa, por lo que se propuso que el AS, inhibe a la catalasa y aumenta el nivel de H₂O₂ (Chen *et al.*, 1993; Conrath *et al.*, 1995; Durner y Klessig, 1996)

En interacciones hospedante-patógeno incompatibles, la reacción hipersensible es un evento clave en el inicio de la manifestación de las reacciones de defensa. La explosión oxidativa, es una rápida respuesta que desarrollan plantas que pueden generar una reacción hipersensible, cuando son inoculadas con patógenos y precede a la acumulación local y sistémica de AS (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990).

El desarrollo de la reacción hipersensible, también promueve el gradual establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (RSA)(Dangl *et al.*, 1996; Gaffney, 1993; Ryals *et al.*,

1996; Bovié *et al.*, 2004). Se denomina así, a la capacidad temporal o permanente de las plantas de ser resistentes a patógenos como consecuencia de un estímulo externo y activar mecanismos que ayudan a prevenir la penetración o el desarrollo de patógenos en el tejido del hospedante (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997). La RSA también ha sido definida como la reducción en el número y tamaño de lesiones locales inducidas por virus (Ross, 1961, citado por Király *et al.*, 2002). El rol central del AS en el inicio de RSA, fue demostrado en plantas transgénicas de tabaco que expresan constitutivamente el gen bacteriano de la enzima salicilato hidroxilasa (*NahG*), que degrada el AS en catecol. Las plantas mutantes luego de la inoculación con TMV mostraron lesiones necróticas mayores que las del material silvestre (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994).

Recientemente, se ha encontrado estudiando la interacción entre *Arabidopsis thaliana* y cepas no virulentas o virulentas de *Pseudomonas syringae*, que elicitores de esta bacteria pueden iniciar RSA, aumentar los niveles de AS y la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis sin provocar RH ni síntomas necróticos (Mishina y Zeier, 2007) y proponen que en *Arabidopsis* estos últimos no son necesarios para el inicio de RSA.

ROL DE LAS ESPECIES ACTIVAS DE OXÍGENO Y EL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN LA CÉLULA VEGETAL

Las especies activas del oxígeno (EAOs) son formas parcialmente reducidas del O₂ atmosférico, estos compuestos participan en el desarrollo, en la acción hormonal, en la transmisión de señales involucradas en el transporte de iones (Foreman *et al.*, 2003), en la expresión génica (Neill *et al.*, 2002) y en la respuesta a estrés biótico (Hancock *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 1998) y abiótico (Mittler, 2002).

En la célula vegetal, las especies activas del oxígeno, principalmente el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el anión superóxido (O₂^{•-}) y el radical oxidrilo (HO*) son generados en el citosol, cloroplastos, mitocondrias y espacio apoplástico (Mittler, 2002; Bowler y Fluhr, 2000). Existen 3 tipos principales de productores de EAOs: las cadenas de transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias, algunas peroxidasas y oxidasas como NADPH oxidasa, NADH oxidasa, xanthine oxidasa, lipoxigenasa, glycolato oxidasa y amino

oxidasa y fotosintetizadores como la clorofila (Edreva, 2005). La NADPH oxidasa unida a membrana transfiere equivalentes reductores desde el NADPH citosólico al oxígeno extracelular generando superóxido, luego la enzima superóxido dismutasa (SOD) apoplástica lo dismuta y transforma en H₂O₂ (De Gara *et al.*, 2003). El H₂O₂ extracelular puede producirse directamente por medio de enzimas apoplásticas como: cuamino oxidasa, polyaminoflavin oxidasa, oxalato oxidasa y peroxidasa (De Gara *et al.*, 2003; Yakimova *et al.*, 2006).

El H₂O₂ actúa como mensajero por poseer características químicas como: estabilidad, falta de carga eléctrica, pequeño tamaño, ser difusible a través de membranas y poseer propiedades oxidoreductoras. Es una señal intracelular del cloroplasto al citosol, intercelular y entre órganos (Edreva, 2005).

El estrés oxidativo, una consecuencia negativa de la presencia de especies activas del oxígeno, ha conducido a extensos estudios del sistema antioxidante vegetal (Mittler, 2002), que incluye moléculas como el ascorbato y glutatión y la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX). La SOD dismuta el O₂^{•-} a H₂O₂, y la CAT y APX degradan el H₂O₂ a H₂O (Yakimova *et al.*, 2006). El balance entre la actividad de la SOD y la APX o la CAT en las células es crucial para determinar el nivel estacionario del O₂^{•-} y del H₂O₂ (Bowler *et al.*, 1991).

ROL DE LAS ESPECIES ACTIVAS DE OXÍGENO Y EL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN LA RESPUESTA DE LA CÉLULA VEGETAL FRENTE AL ESTRÉS

La presencia de especies activas de oxígeno es una respuesta común a numerosas situaciones de estrés de origen ambiental (Foyer *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2002), como la presencia de contaminantes ambientales (ozono, dióxido de azufre, óxido nítrico), radiación UV, metales pesados, etc. Otra causa de generación de EAOs es la reducción de la fijación de CO₂ por altas o bajas temperaturas, deficiencias minerales, déficit hídrico y estrés salino (Edreva, 2005), exceso de excitación energética y daño mecánico (Chang, 2005).

Chang, 2005, estudió la respuesta fisiológica y molecular de mutantes y líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* para investigar la red de señales que controlan la respuesta biótica y abiótica frente al estrés. En hojas heridas, la actividad de la enzima APX2 aumentó solamente después que se expusieron a una dosis de luz excesiva, esta respuesta no se relacionó a vías de señales dependientes del ácido jasmónico, quitosano o ácido absísico, pero sí fue necesario el transporte de electrones fotosintético. La inducción de APX2, fue precedida por una reducción en la tasa de fijación de CO₂.

En cuanto a las catalasas, las plantas tienen múltiples isoformas de estas enzimas diferencialmente reguladas en varios tejidos durante el desarrollo y diferentes estrés ambientales (Lee y An, 2005). En tabaco se hallaron dos catalasas reguladas por AS y en arroz existe una CAT insensible a AS (Chen *et al.*, 1997; Durner y Klessig, 1996). Lee y An, 2005, en pimiento para pimentón (*Capsicum annuum* L.) aislaron 3 catalasas que se expresan diferencialmente en varios órganos. Estos autores encontraron que *CaCat1* y *CaCat2* se regulan diferencialmente por el ritmo circadiano y tienen diferente distribución espacial entre hojas y tallos y que los transcriptos de *CaCat3* se hallaban en niveles similares en distintos órganos y independientemente de la fase luz/oscuridad. Mientras que los tratamientos con paraquat y heridas aumentaron el nivel de ARNm de *CaCat1* en hojas de pimiento tratadas y no tratadas, las heridas no aumentaron la actividad CAT en hojas, como el paraquat. La actividad CAT no aumentó en los tallos con ninguno de los tratamientos.

ROL DE LAS ESPECIES ACTIVAS DE OXÍGENO Y EL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES COMPATIBLES E INCOMPATIBLES ENTRE PATÓGENOS Y PLANTAS

Como se expuso anteriormente, la interacción entre plantas y patógenos potenciales define dos grandes grupos: plantas potencialmente hospedantes y no hospedantes. Entre las primeras, la interacción con el patógeno puede ser compatible o incompatible. Las interacciones compatibles resultan en la proliferación del patógeno en la planta y en el desarrollo de síntomas sistémicos, mientras que las interacciones incompatibles inducen una respuesta de defensa de las plantas que restringe la sistematización del mismo (Gabriel y Rolfe, 1990). Durante este último proceso, se produce la interacción del producto de un

gen de avirulencia en el patógeno (Avr), que se une al receptor codificado por el correspondiente gen de resistencia del hospedante (R) (Baker *et al.*, 1997).

La generación de EAOs es una característica común en interacciones planta-patógeno compatibles e incompatibles (Bolwell *et al.*, 1998; Bolwell *et al.*, 2002). En interacciones incompatibles la resistencia del hospedante se basa en un primer reconocimiento del patógeno por la planta, seguido por una rápida explosión oxidativa, con la acumulación de H₂O₂ (Mehdy, 1994; Lee y Hwang, 2005) y una respuesta hipersensible (RH), disparada por este último (Dangl *et al.*, 1996; Raskin, 1992; Baker *et al.*, 1997; Yakimova *et al.*, 2006), que involucra la muerte programada de células (MCP) y la activación coordinada de una batería de mecanismos de defensa, que impiden el progreso de la infección. Como se expuso anteriormente la MCP es un mecanismo que tiene como objetivo eliminar células muertas redundantes o peligrosas durante el ciclo de vida de organismos multicelulares.

En las células humanas existe un factor denominado APAF1, que se une a un complejo de alto peso molecular llamado apoptosoma, el cual una vez ensamblado activa las caspasas para iniciar la apoptosis. Existe homología entre varios productos de genes de resistencia vegetal y el factor humano APAF1. La MCP se diferencia de la necrosis vegetal, en que esta última es producto de la muerte celular pasiva a causa de traumas severos sufridos durante situaciones extremas de estrés, independiente de la actividad celular (Dat *et al.*, 2003).

El radical libre gaseoso óxido nítrico (ON) también actúa como señal en plantas y animales. La muerte celular programada se activa por un balance entre EAOs y ON, el ON captura el O₂⁻ y no permite que se transforme en H₂O₂. El calcio es otro elemento importante en la MCP, es un mensajero intracelular universal en animales y plantas. Elevados niveles de calcio fueron observados coincidentemente con la diferenciación de tráqueas, formación de aerénquima, diferenciación de aleurona, respuesta hipersensible y senescencia de hojas (Hoeberichts y Woltering, 2002).

El ácido salicílico vía arriba de MCP afecta el estado de fosforilación de un componente señal que activa la explosión oxidativa (Alvarez, 2000); vía abajo en tabaco,

induce a las cascadas de kinasas (MAPKs) implicadas en la activación de RH (Zhang y Klessig, 1997, 2001). Bajas concentraciones de AS no activan MCP, pero sí respuestas de defensa, altas concentraciones de AS inducen MCP. En relación a estos resultados, Barna *et al.* (2003), encontraron que la acumulación de peróxido de hidrógeno estaba atenuada, en plantas de tabaco Xanthi-nc infectadas con TMV y tratadas con AS o manifestando RSA por una inoculación previa con TMV.

En cuanto a la acción de otros reguladores vegetales, el ácido jasmónico regula negativamente la MCP ya que atenúa la producción de EAOs, el etileno y el ácido giberélico (AG) inducen muerte celular programada, el ácido abscísico (AB) no tiene este efecto. Mientras que el AG reduce la actividad de enzimas que capturan EAOs, el AB hace que esta actividad se mantenga (Hoeberichts y Woltering, 2002).

El desarrollo de la reacción hipersensible, también promueve el gradual establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (RSA)(Dangl *et al.*, 1996), que confiere resistencia a largo plazo a un amplio espectro de patógenos normalmente virulentos (Gaffney, 1993; Ryals *et al.*, 1996). Alvarez *et al.*, (1998), encontraron que la explosión oxidativa primaria, induce otras explosiones secundarias, dispersas sistémicamente por la planta en forma de micro respuestas hipersensibles, siendo ambos tipos de RH necesarios para que ocurra RSA.

Las especies activas del oxígeno tienen un efecto dual en este proceso, promueven la apoptosis a altas concentraciones, pero inducen la síntesis de antioxidantes a bajas dosis (Hoeberichts y Woltering, 2002). Los antioxidantes inhiben la expansión de áreas necróticas que facilitan la penetración de fitopatógenos necrotróficos (De Gara *et al.*, 2003). Los cambios inducidos en la expresión de los genes responsables del sistema antioxidante, modifican la respuesta de la planta a estrés de origen biótico y abiótico. El éxito de la reacción hipersensible dependerá de la supresión de los sistemas de eliminación de especies activas del oxígeno y del desbalance del estado redox del ascorbato y el glutatión (De Gara *et al.*, 2003).

CAMBIOS EN EL HOSPEDANTE OCASIONADOS POR EL ESTRÉS TÉRMICO QUE AFECTAN EL PROCESO DE INFECCIÓN VIRAL

B) ACUMULACION DE PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO

La habilidad de un virus para moverse dentro de la planta está dada por la compatibilidad entre la proteína de movimiento viral y las proteínas del hospedante (Scholthof, 2005). Como se expuso anteriormente, las células sometidas a altas temperaturas sufren cambios en la expresión de diversos genes involucrados en la respuesta al estrés, que pueden alterar la reacción del hospedante frente al patógeno. A su vez los virus regulan la expresión de genes del hospedante, reprimiendo la traducción del ARN en el frente de avance de la infección (Aranda y Maule, 1998). Estos cambios consisten en la interrupción transitoria de la síntesis de proteínas del hospedante, a excepción de las proteínas de choque térmico y la ubiquitina. Esta última es un pequeño polipéptido, altamente conservado, involucrado en marcar proteínas que deben degradarse, está involucrada con la respuesta al estrés biótico y abiótico y está codificada por una familia de genes llamada polyubiquitina.

Los cambios fisiológicos sufridos por las células del hospedante, que se encuentran en el frente de ataque viral, tienen algunas características comunes con las sufridas ante el estrés térmico. Una de las explicaciones a este efecto, postula que las proteínas de choque térmico son útiles al patógeno, por eso son las únicas que no son inhibidas en la capa de células donde se encuentra el frente de infección viral; esto último explicaría por qué algunos virus codifican sus propias proteínas de choque térmico (Aranda y Maule, 1998)

Aranda *et al.* (1996), examinaron el frente de invasión viral en embriones inmaduros de arveja infectados con PSbMV (“Pea seed borne mosaic virus”) y encontraron que conjuntamente con el comienzo de la replicación viral, se indujo la expresión de *Hsp70* inducida por calor y poliubiquitina, así como también se inhibió la síntesis de lipoxigenasa. Por otra parte, Havelda y Maule (2000) observaron acumulación de *Hsp70* en células de *Cucurbita pepo* infectadas con CMV, en una reacción compatible. Sin embargo, PSbMV induce *Hsp70* pero no el factor de transcripción inducido por calor *Hsf*, por lo que se

supone que existe un control selectivo de la expresión de genes inducidos por el calor, durante la infección viral (Aranda *et al.*, 1999).

Existen otros ejemplos de relación entre proteínas de choque térmico y virus. Estas proteínas podrían servir de chaperonas a los virus que requieren de sus servicios para cumplir determinadas funciones, entre las cuales se encuentran la replicación viral y el movimiento de célula a célula, esto ocasionaría una mayor sistematización de la infección y mayor concentración viral en reacciones compatibles (Agarwal *et al.*, 2002). Existen numerosas citas en que se describe la inducción por parte de los virus, de la expresión de chaperonas celulares como Hsc70, Hsp40 y Hsp90, aunque no es claro si son requeridas directamente para la función viral o inducidas por el estrés causado por la infección.

Las Hsc70 se inducen en etapas tempranas de la infección viral y su expresión es regulada por el ciclo celular. Se las ha encontrado relacionadas con la actividad de los plasmodesmos (Aoki *et al.*, 2002). La hipótesis de que los virus inducen su síntesis para facilitar la infección, se ve apoyada por el hecho de que algunos virus codifican sus propias chaperonas (polyomaviridae y closterovirus). Otro caso que refuerza esta hipótesis, es que para un virus mutante para el gen Gam1 que eleva el nivel de Hsp70 y Hsp40 en células infectadas, el aumento en el nivel de chaperonas mediante la aplicación de estrés térmico, restauró la capacidad de replicación viral (Sullivan y Pipas, 2001; Scheibel y Buchner, 1998; Sainis *et al.*, 1994).

Otro ejemplo de interacción entre síntesis de proteínas de choque térmico y proteínas virales involucradas en el proceso de infección viral, es la proteína de movimiento viral NSm de TSWV. Esta proteína interactúa con homólogos de DnaJ, las cuales son reguladoras de Hsp70 en mamíferos, por lo que se supone que el movimiento de TSWV es dependiente de Hsp70 (Soellick *et al.*, 2000). Las proteínas homólogas de DnaJ son chaperonas, importan proteínas al retículo endoplasmático o mitocondrias, se acumulan en respuesta a la infección con TSWV y al estrés térmico. El dominio J de las chaperonas DnaJ se une a la proteína Hsp70 que se une a microtúbulos. Gracias a la interacción con las chaperonas DnaJ y Hsp70, la nucleocápside unida a NSm se une al citoesqueleto (von Bargen *et al.*, 2001). La interacción de la proteína N con la NSm y la conexión de ésta con la proteína vegetal DnaJ, que interactuaría con las Hsp70, forman parte de una red de

interacciones involucradas en el movimiento célula a célula de los virus (Schereier, 2001) y demuestra cómo el estrés térmico puede influir en este proceso, al inducir cambios en la expresión de chaperonas como la Hsp70.

Otro ejemplo documentado de relación entre proteínas de choque térmico y virosis es la relación entre la secuencia líder llamada Ω en TMV, que funciona como un promotor de traducción en plantas, esta secuencia se une a la Hsp101, requerida para promover la traducción, esta última se vio incrementada después de la aplicación de estrés térmico que elevó la expresión de la Hsp101 (Gallie, 2002).

Como se expuso anteriormente, la reacción hipersensible (RH) es una forma de muerte celular asociada con la resistencia de las plantas a los patógenos, ocurre en interacciones incompatibles y en algunas compatibles (Yakimova *et al.*, 2006). La muerte celular programada (MCP), es un mecanismo que tiene como objetivo eliminar células redundantes o peligrosas durante el ciclo de vida de organismos multicelulares (Hoeberichts y Woltering, 2002). En la célula vegetal la MCP, interviene en la xylogénesis, formación de aerénquima, senescencia de pétalos, desarrollo de endosperma, respuesta a patógenos y estrés abiótico. Los eventos y enzimas que caracterizan la MCP, son la condensación y encogimiento del citoplasma y núcleo, formación de cuerpos apoptóticos que contienen ADN, degradación de ADN, proteasas (llamadas caspasas en la célula animal)(Vaux, 2002) y liberación de citocromo c del mitocondria al citosol (Hoeberichts y Woltering, 2002; Dat *et al.*, 2003). Las EAOs, el calcio y el etileno, intervienen en la MCP (Yakimova *et al.*, 2006).

Las proteínas de choque térmico, también podrían influir en la susceptibilidad a virus inhibiendo la muerte celular programada, la cual es parte de la respuesta de la planta al patógeno en interacciones incompatibles. (Buzzard *et al.*, 1997; Beere y Green, 2001; Le Blanc, 2003; Pandey *et al.*, 2000). En tomate, se encontró que el estrés térmico protege a suspensiones celulares de MCP inducida por camptothecina. (Hoeberichts y Woltering, 2002).

B) ACTIVACION DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE

Otro cambio observado en las plantas sometidas a estrés térmico es la activación del sistema antioxidante. En tomate, por ejemplo, plantas sometidas a 35 °C mostraron mayor concentración de H₂O₂ y expresión de la enzima superóxido dismutasa (SOD) férrica en hojas comparado con un control mantenido a 25 °C, así como menor expresión de la enzima catalasa (CAT)(Rivero *et al.*, 2003).

El aumento en la actividad de estas enzimas también se ha visto incrementado como respuesta a la infección viral. Maule *et al.* (2002), encontraron la inducción de catalasa cerca del sitio de la infección viral, esto último podría ser útil al patógeno para frenar la explosión oxidativa que tiende a aislarlo dentro del tejido infectado. Coincidiendo con este último trabajo, en interacciones compatibles de *Cucumis sativus* y *Cucurbita pepo*, con CMV y “zucchini yellow mosaic virus”, se observó un aumento de actividad de las enzimas SOD, CAT y APX. También un aumento de peroxidación, ácidos grasos poliinsaturados y aumento de la actividad peroxidasa (Riedle-Bauer, 2000).

Los autores de los trabajos más antiguos que describen el efecto del estrés térmico en distintas interacciones virus-hospedante atribuyeron sus resultados a cambios fisiológicos ocasionados por el estrés térmico como la reducción de carbohidratos (Kassanis, 1952; Bawden y Roberts, 1947, 1948; Wiltshire, 1956), el aumento en el poder de invasión del virus (Yarwood, 1958), el retraso en el inicio de la reacción hipersensible y la consecuente muerte de células infectadas y disminución de la tasa de deposición de calosa (Wu *et al.*, 1969), y a modificaciones en la capacidad diferencial para soportar el inicio y desarrollo de una infección viral (Helms y Mc Intyre, 1964). En la década del 90 se describió la inestabilidad de algunos genes de resistencia a altas temperaturas para algunos virus incluido TSWV (Valkonen y Watanabe, 1999; Moury *et al.*, 1998) y la pérdida de capacidad de desarrollar la reacción en plantas sometidas a estrés térmico, fue asociada a una baja acumulación de ácido salicílico (AS) (Raskin, 1992).

En los últimos años se han realizado importantes aportes al conocimiento de los procesos fisiológicos que modulan la infección viral y a la relación entre el estrés térmico y

el aumento de predisposición del hospedante. Uno de estos avances involucran a las proteínas de choque térmico, éstas juegan un rol primordial en mantener la estructura proteica luego de someter a las células a altas temperaturas pero además, la expresión de algunas de ellas como las Hsp70 es inducida por un amplio rango de virus incluyendo miembros de los géneros Potyvirus, Tobravirus, Potexvirus, Geminivirus y Cucumovirus (Aranda *et al.*, 1996; Whitham *et al.*, 2003; Aparicio *et al.*, 2005) y su acumulación ha sido observada en distintos patosistemas (Havelda y Maule, 2000).

Otra alteración de los procesos celulares que se identifican como producto del estrés térmico y podría afectar la respuesta de la planta frente a la infección viral es la liberación de EAOs (Dat *et al.*, 1998; Edreva, 2005; Rizhsky, 2002 y Rivero *et al.* 2003), éstas generan daños celulares y el aumento en la actividad de enzimas antioxidantes que actúan para prevenirlos; algunas de estas enzimas son inducidas por los mismos virus en el sitio de la infección (Escaler *et al.*, 2000; Maule *et al.*, 2002; Riedle-Bauer, 2000; Li y Burritt, 2003; Díaz Vivancos *et al.*, 2006).

Esta tesis se basó en la hipótesis de que la exposición de plantines de tomate a altas temperaturas incrementa su predisposición a las infecciones con TSWV, cuya verificación y el estudio de algunos aspectos fisiológicos asociados constituyen el trabajo experimental. Los antecedentes que sustentan cada etapa del trabajo son expuestos en los capítulos pertinentes.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS 1

La exposición de plantines de tomate a altas temperaturas incrementa su predisposición a las infecciones con TSWV, efecto que tiene una duración determinada luego de finalizado el choque térmico.

Este aumento de predisposición se traducirá en aumento de la severidad de síntomas sistémicos, reducción del crecimiento y modificación de parámetros productivos en cultivares susceptibles y aumento del número de lesiones necróticas en los folíolos inoculados en los cultivares resistentes.

HIPÓTESIS 2

El ácido salicílico está involucrado en el aumento de susceptibilidad a TSWV ocasionado por el estrés térmico. Genotipos deficientes en la producción de AS serán particularmente susceptibles a la infección viral.

La aplicación exógena de ácido salicílico puede contribuir a reducir la incidencia de TSWV en cultivos comerciales de tomate sin provocar alteraciones en el crecimiento ni en parámetros productivos.

HIPÓTESIS 3

Los mecanismos de defensa ante la infección viral, en plantas sometidas a estrés térmico, dependen de un incremento de especies activas de oxígeno (EAOs), específicamente H_2O_2 .

Genotipos deficientes en la producción de H_2O_2 serán particularmente susceptibles a la infección viral.

Las altas temperaturas inducen en el hospedante aumentos en susceptibilidad a las infecciones, en coincidencia con incrementos en la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de episodios de estrés térmico en el período previo a la inoculación de plantines de tomate con TSWV, sobre la predisposición de los mismos a la infección viral y estudiar las bases fisiológicas de tal respuesta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO 1

Establecer un sistema experimental donde se altere la expresión de síntomas de TSWV, alterando las condiciones ambientales de temperatura.

Evaluar la predisposición a la infección con TSWV (medida como incidencia, intensidad y progreso de la enfermedad) en plantines de tomate susceptibles y resistentes a tospovirus, sometidos a pretratamientos con alta temperatura. Estudiar las consecuencias de este cambio de susceptibilidad sobre el crecimiento y parámetros productivos.

Determinar cuántas horas de estrés térmico son necesarias para modificar la predisposición a TSWV en cultivares de tomate resistentes y susceptibles a la enfermedad.

Determinar cuántas horas dura el efecto del estrés térmico sobre la predisposición a TSWV en cultivares de tomate resistentes y susceptibles.

OBJETIVO 2

Determinar los efectos de aplicaciones exógenas de ácido salicílico sobre el progreso de la infección y la severidad de síntomas producidos por TSWV, en plantas de cultivares de tomate resistentes y susceptibles y en genotipos deficientes en la producción de AS, pretratadas con estrés térmico.

Describir los efectos de aplicaciones exógenas de ácido salicílico en cultivos de tomate sometidos a presión de inóculo natural.

Determinar el efecto de aplicaciones exógenas de ácido salicílico sobre el crecimiento y la parámetros productivos de cultivos comerciales de tomate resistentes y susceptibles a la infección por TSWV

OBJETIVO 3

Describir los efectos de aplicaciones exógenas de H_2O_2 sobre la susceptibilidad a la infección por TSWV, en plantas provenientes de tratamientos de estrés térmico de cultivares de tomate resistentes y susceptibles a este patógeno.

Evaluar la susceptibilidad frente a TSWV de plantas de tomate deficientes en la producción de H_2O_2 , sometidas a estrés térmico previo a la inoculación.

Describir los efectos de los tratamientos de estrés térmico y la infección con TSWV sobre la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en hojas de cultivares de tomate resistentes y susceptibles al patógeno.

EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS DE “PESTE NEGRA”, EL CRECIMIENTO Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN GENOTIPOS DE TOMATE SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A TSWV

INTRODUCCION

La exposición de una planta a altas temperaturas incrementa su susceptibilidad a muchos organismos patógenos incluyendo virus (Yarwood, 1976). Los tratamientos de estrés térmico posteriores a la inoculación, han tenido efectos diversos dependiendo del tiempo, de la temperatura y del momento de la aplicación con respecto a la inoculación; sin quedar claro si el efecto ha sido en el establecimiento de la infección inmediatamente después de la inoculación o en la replicación viral y traslocación subsecuentes (Goodman *et al.*, 1986).

Dentro de los efectos estudiados, la expresión de reacciones necróticas frente a una infección viral está afectada por condiciones ambientales, entre ellas la temperatura antes o después de la infección (Zheng *et al.*, 2005). Kassanis (1952) obtuvo un incremento en la susceptibilidad en plantas sometidas a 36 °C durante 6 horas a 2 días previamente a la inoculación con un mayor efecto cuando el tratamiento tuvo mayor duración. Los patosistemas estudiados fueron poroto-TNV, *N. glutinosa*-TMV, *N. glutinosa*-TBSV, tobacco-TSWV. El tiempo requerido para la máxima respuesta, dependió de la edad y estado fisiológico general de la planta, a mayor edad, más largo debió ser el tratamiento. El síntoma observado fue el aumento en el número de lesiones necróticas y el efecto fue inverso cuando el estrés fue aplicado después de la inoculación. Kassanis interpretó sus resultados relacionando el aumento en la predisposición, con la reducción de carbohidratos ocasionada por el estrés térmico, estos datos son coherentes con los obtenidos por otros autores: mayor número de lesiones locales en distintas interacciones hospedante virus sombreando las plantas antes de la inoculación (Bawden y Roberts (1947, 1948) y mayor

número de lesiones necróticas en poroto ocasionadas por TNV tanto si las plantas eran sombreadas como si estaban iluminadas pero se disminuía la concentración de dióxido de carbono en el ambiente luego de la inoculación (Wiltshire, 1956).

Yarwood (1958), en pepino inoculado con TSWV y sumergido 20 segundos en agua caliente a 50° C luego de la inoculación, observó un aumento en el número de lesiones y en el tamaño de éstas. Igual efecto observó en poroto y caupí inoculados con TMV, TRSV, PYBMV o AMV, este efecto se atribuyó a daños ocasionados por la exposición a las altas temperaturas sufridos por el hospedante. El estrés térmico provocó la aparición de infecciones sistémicas en lugar de infecciones locales en las interacciones poroto-TSWV y pepino-TMV (10-60 segundos a 50° C de 1 a 5 días luego de la inoculación). Yarwood atribuyó sus resultados, a un aumento en el poder de invasión del virus y/o en la necrosis causada por muchas infecciones que de otra manera no hubieran aparecido.

Hutton y Peak (1952), citados por Finley (1953), encontraron que en algunos materiales resistentes, la eficiencia en desactivar a TSWV variaba considerablemente con la temperatura y sugería una temperatura de 32° C para facilitar la selección de fenotipos susceptibles y resistentes.

Gonzalez y Pound, (1963), encontraron mayor número de plantas de *N. glutinosa* infectadas con CVA cuando éstas fueron mantenidas a 28 °C antes de la inoculación, con respecto de aquellas mantenidas a 20 °C y mayor concentración de virus en los tratamientos postinoculación a 28 °C que a 20 °C. El número y tamaño de las lesiones a 28 °C fueron mayores que a 20 °C, este efecto fue aumentando progresivamente con el aumento de la temperatura. Para estos autores, ésta fue el factor ambiente más importante, afectando la severidad de la infección y el tipo de síntomas y citan experiencias de otros investigadores (Pound y Walker, 1945), en que la concentración de CVA, fue muy alta a 28 °C, pero declinó progresivamente a medida que la temperatura se redujo a 16 °C. También citan los resultados de (Pound y Weathers, 1953), en que hojas de *N. glutinosa* mantenidas a altas temperaturas, fueron más susceptibles a infecciones iniciales de CVA.

Otras experiencias son las de Samuel (1931) (citado por Kassanis, 1952) quien encontró, que el virus del mosaico del tabaco, producía lesiones cloróticas y moteados sistematizados cuando *Nicotiana glutinosa* era mantenida a 35 °C, en lugar de las lesiones necróticas localizadas que se producían a temperaturas más bajas; por otra parte, Best (1936 citado por Kassanis, 1952) encontró que TMV en *Nicotiana glutinosa* y TSWV en *Nicotiana tabacum* producían un 30 % más de lesiones si la temperatura ambiente era elevada de 15 a 20 °C.

Wu *et al.*, (1969), sumergieron hojas de poroto (*Phaseolus vulgaris*, L.) en agua caliente a 50 °C durante 10 a 60 segundos y las inocularon con TMV, encontraron mayor número de lesiones y mayor tamaño de éstas, en función de la dosis de calor aplicada. En este ensayo, el tratamiento de calor luego de la inoculación, retrasó la reacción hipersensible de muerte de células infectadas y disminuyó la tasa de deposición de calosa, con una correlación positiva entre el tamaño de las lesiones y la deposición de este compuesto en las células sanas adyacentes. Estos autores también encontraron, que la infectividad del virus extraído de las lesiones de las hojas estresadas, era mayor a medida que aumentaba la dosis de estrés y concluyeron que el retraso en la aparición de las necrosis y aumento de las mismas podría aumentar la duración de la replicación viral en células estresadas con respecto al control.

Helms y Mc Intyre, 1964, estudiaron el efecto de cortos tratamientos pre y post inoculación (49-50 °C por 30 segundos en agua caliente), en el número y tamaño de lesiones en hojas de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.), inoculados con TMV, razas 1 y 2 y sus respectivos ácidos ribonucleicos, encontrando que la relación entre el número de lesiones de las hojas tratadas y el testigo fue mayor que uno. En todos los casos el calor aumentó el tamaño de las lesiones, los cambios en número y tamaño de éstas variaron según el inóculo. Según estos autores, las células sometidas a estrés térmico pasaban por distintos estados fisiológicos, reconocibles por una capacidad diferencial para soportar el inicio y desarrollo de una infección viral. Tu (1989) encontró que existe un rol de la temperatura post inoculación en el desarrollo de necrosis ocasionada en poroto por BYMV, el porcentaje de plantas que desarrollaron síntomas y la concentración viral aumentó de 16 a 24 °C pero disminuyó de 24 a 28 °C.

En los trabajos citados anteriormente, la duración del tratamiento de altas temperaturas, que aumentó la susceptibilidad fue variable, 4 días a 36 °C (Kassanis, 1952) o un segundo a 55 °C (Yarwood, 1956). En cuanto a la duración de esta predisposición ocasionada por altas temperaturas, ésta varió de 15 minutos en porotos a 10 °C (Panzer, 1958), 3 días en la misma especie expuesta 10 segundos a 50 °C (Yarwood, 1956) e inoculada con el virus del mosaico del tabaco, hasta 24 días en caña de azúcar expuesta al calor e inoculada con el virus del mosaico de la caña de azúcar (Benda, 1971), todos citados por Yarwood (1976).

Experiencias más recientes confirman los resultados obtenidos en décadas pasadas. Plantas de tabaco resistentes, inoculadas con TMV desarrollaron infecciones sistémicas a 32 °C, con fallas en la acumulación de PR-1. Esta pérdida de la capacidad de desarrollar RH a altas temperaturas, fue asociada a una baja acumulación de ácido salicílico. Aplicando éste último en forma exógena a las hojas, se indujo la síntesis de PR-1 a 24 y 32 °C (Raskin, 1992).

Valkonen y Watanabe (1999), encontraron que el gen de resistencia al virus del mosaico de pepino (CMV) en papa no se expresa a 28 °C y sí a 18 °C. Este gen estaría relacionado con la falta de un factor en el hospedante, requerido para que exista una interacción compatible que permita el transporte a larga distancia del virus, o a la imposibilidad de CMV de suprimir eficientemente los mecanismos de silenciamiento génico en papa. Según estos autores algunos genotipos de papa que expresan el gen dominante de resistencia a PVY, pierden esta condición a altas temperaturas. Estos datos coinciden con los de Moury *et al.* (1998), quienes observaron que la resistencia a TSWV conferida por el gen Tsw en pimiento es menos estable a 32 °C que a 22 °C.

La alteración en la expresión de síntomas sistémicos fue estudiada por Brakke y Samson (1981), estos autores encontraron que el efecto de las altas temperaturas alteraba de manera diferencial la interacción planta-patógeno, BSMV que WSMV. Mientras que el cultivo era más susceptible a BSMV si las plantas eran mantenidas a 25 °C en lugar de 35 °C luego de la inoculación, algunas líneas eran más susceptibles a WSMV a mayores temperaturas, mientras que para algunas líneas no había diferencia.

En otras interacciones planta patógeno compatibles, Soler *et al.*, (1998), encontraron una interacción significativa entre la edad del hospedante y el régimen de temperatura, con una mayor susceptibilidad a regímenes de 30/18 °C (día/noche) que 25/18, en poblaciones de *Capsicum chinense*, resistentes a TSWV. Llamas-Llamas *et al.*, (1998), observaron mayor severidad de síntomas en plantas de *Nicotiana tabacum* cv. White Burley, *Datura stramonium* y *Physalis ixocarpa* mantenidas a alta temperatura e inoculadas con TSWV. Estos autores obtuvieron en tabaco, mayor acumulación de virus en distintos tejidos de la planta, para el tratamiento con altas temperaturas, salvo en las hojas inoculadas, donde la concentración fue mayor a bajas temperaturas.

Díaz-Pérez *et al.*, (2007), estudiaron el efecto de la temperatura radicular sobre la expresión de síntomas de TSWV y el crecimiento y rendimiento en tomate inoculado artificialmente o sometido a infección natural. En este trabajo el peso de la biomasa aérea y el rendimiento fueron mayores cuanto mayor tiempo las plantas se mantuvieron libres del patógeno bajo los dos sistemas de inoculación y éste tiempo fue mayor en los tratamientos que lograron mantener menor temperatura radicular utilizando distintos colores de mulch. Dado que el color del mulch afecta a la población del vector que puede verse atraída hacia el cultivo en menor o mayor medida, es difícil en este trabajo separar este efecto aunque las plantas inoculadas artificialmente respondieron de la misma manera que aquellas sometidas a inóculo natural.

Los antecedentes detallados anteriormente sobre aumentos de susceptibilidad a virosis ocasionada por la exposición del hospedante a altas temperaturas, permiten formular la hipótesis de que el estrés térmico provoca cambios en la fisiología del hospedante que facilita el desarrollo de enfermedades de origen viral. Particularmente en el caso del cultivo de tomate, la exposición del cultivo a altas temperaturas en la etapa de plantín podría incrementar su predisposición al tospovirus TSWV. Dado que dentro de los síntomas sistémicos ocasionados por este patógeno se encuentran alteraciones en la altura de las plantas y formas de los frutos, es de esperar que se observen asociados al aumento de susceptibilidad por estrés térmico, cambios en parámetros de crecimiento y de producción.

HIPÓTESIS

La exposición de plantines de tomate a altas temperaturas incrementa su predisposición a las infecciones con TSWV, efecto que tiene una duración determinada luego de finalizado el choque térmico.

Este aumento de predisposición se traducirá en aumento de la severidad de síntomas sistémicos, reducción del crecimiento y modificación de parámetros productivos en cultivares susceptibles y aumento del número de lesiones necróticas en los folíolos inoculados en los cultivares resistentes.

OBJETIVOS

Establecer un sistema experimental donde se altere la expresión de síntomas de TSWV, alterando las condiciones ambientales de temperatura.

Evaluar la predisposición a la infección con TSWV (medida como incidencia, intensidad y progreso de la enfermedad) en plantines de tomate susceptibles y resistentes a tospovirus, sometidos a pretratamientos con alta temperatura. Estudiar las consecuencias de este cambio de susceptibilidad sobre el crecimiento y parámetros productivos.

Determinar cuántas horas de estrés térmico son necesarias para modificar la predisposición a TSWV en cultivares de tomate resistentes y susceptibles a la enfermedad.

Determinar cuántas horas dura el efecto del estrés térmico sobre la predisposición a TSWV en cultivares de tomate resistentes y susceptibles.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES GENÉTICOS UTILIZADOS

Para las experiencias, se utilizaron dos híbridos comerciales de tomate, ya probados en diferentes épocas de cultivo y condiciones de manejo: Gol, heterocigota para el gen Sw5 que confiere resistencia a tospovirus y Bonanza, susceptible, ambos con similar estructura de planta y tipo de fruto (hábito de crecimiento indeterminado, fruto redondo de firmeza estructural)(Mitidieri *et al.*, 1996b, 2001)

ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

Obtención de plantines

Previamente a la germinación se realizó un tratamiento a las semillas con 1.5 % HCL durante 24 h para prevenir la presencia de TMV a través de la pulpa (Córdoba *et al.*, 1991). Se realizó la siembra en bandejas de termoformado (60 cc/celda) sobre un sustrato estéril a base de una mezcla de una parte de turba, una de perlita y una de tierra que fue regado con solución nutritiva de Hoagland. El sustrato se mantuvo a capacidad de campo. Los plantines se obtuvieron bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento, con una temperatura de 25 °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz a 52000 lux, mediante lámparas de vapor de sodio de alta presión de 400 watts.

Preparación del inóculo

Se utilizó una cepa standard de TSWV, proporcionada por el Ing. Elvio Biderbost, que fue mantenida a -70 °C en freezer y multiplicada sobre plantas sanas de *Nicotiana rustica* mantenidas en invernadero. El inóculo se preparó moliendo (1/10 peso/volumen de buffer extracción) hojas jóvenes de *Nicotiana rustica* con síntomas visibles de TSWV en un mortero enfriado y mantenido sobre hielo (Fig. 2.1 C). El medio de extracción fue 0.01 M buffer fosfato pH 7.0 con 0.01 M sulfito de sodio. Las hojas fueron inoculadas mecánicamente frotando el extracto sobre la superficie de hojas previamente espolvoreadas con Carborundum 400-mesh (Córdoba *et al.*, 1991).

Aplicación de los tratamientos de estrés térmico

Los tratamientos de estrés se aplicaron cuando los plantines tuvieron 3-4 hojas verdaderas expandidas. Para la aplicación del tratamiento de estrés térmico se construyeron dos cámaras donde las altas temperaturas (40 °C), se generaron mediante un sistema de resistencias eléctricas, regulado con un termostato (Kassanis, 1952 y Helms y Mc Intyre, 1964)(Fig 2.1. y 2.2 A y B). Las dos cámaras recibieron la misma luminosidad durante un fotoperíodo de 16 horas de luz mediante lámparas de vapor de sodio de alta presión de 400 watts como se mencionó arriba. El sustrato de los plantines fue mantenido a capacidad de campo a lo largo de todas las experiencias.

Las plantas se inocularon, una vez transcurrido el período de estrés y cuando la temperatura de las hojas de plantas tratadas volvieron a igualarse a las del control. Para los experimentos de dosis de estrés se sometió a las plantas a 40 °C durante 1, 4, 8 y 24 horas antes de la inoculación. Para evaluar la duración del efecto del estrés térmico las inoculaciones se realizaron 1, 4, 8 y 24 horas después de finalizado el tratamiento de estrés térmico.

Las temperaturas foliares fueron medidas con sensores adheridos al limbo de la hoja, éstos y los sensores ambientales fueron conectados a un adquisidor de datos de canales analógicos, tomándose registros durante las 24 horas de duración de los tratamientos.

DETERMINACION DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA

En todos los experimentos, previamente a la inoculación, se evaluó el contenido relativo de agua (CRA). Para eso se tomó el peso fresco de 5 folíolos por tratamiento (PF), inmediatamente de finalizados los tratamientos de estrés, y el peso saturado 24 horas después de mantenerlos en contacto con agua en bolsas herméticas de polietileno (PSat). Posteriormente se secaron en estufa a 65 °C durante 2 días consecutivos y se tomó el peso seco de cada uno (PS). El CRA se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PSat}) / (\text{PSat} - \text{PS}) \times 100$$

Esta metodología se utilizó para controlar que las plantas no sufrieran déficit hídrico al momento de la inoculación.

VARIABLES DE RESPUESTA

Incidencia e intensidad de la enfermedad

La manifestación de la enfermedad se evaluó durante 15 días a partir de la inoculación, manteniendo las plantas en condiciones controladas de temperatura (25 °C). En el híbrido susceptible se evaluó incidencia (como el porcentaje de plantas con síntomas) y severidad (Fig 2.2 D). Esta última variable se cuantificó, midiendo el desarrollo de síntomas según una escala visual (Córdoba *et al.*, 1991) asignando valores del 0 al 10 donde 0 = sin síntomas, 1= ligera decoloración de las nervaduras en las hojas cercanas al ápice, 3= 30 % de la planta mostrando epinastia y/o cambios en la coloración de las hojas y nervaduras, 5 = plantas con un 50 % de altura con respecto al testigo sano y mostrando epinastia y/o cambios en la coloración de las hojas y nervaduras en el 50 % de sus hojas y tallos, 7= plantas con un 75 % de altura con respecto al testigo sano y mostrando epinastia y/o cambios en la coloración de las hojas y nervaduras en el 75 % de sus hojas y tallos y 10= muerta.

En el híbrido resistente se contó el número de lesiones necróticas por folíolo inoculado y el tamaño de las mismas (Fig 2.2 E y F), ya que no se observaron síntomas sistémicos como respuesta a la inoculación.

Progreso de la enfermedad

El progreso de la enfermedad se calculó como área bajo la curva de enfermedad según la siguiente ecuación, adaptada a partir de la fórmula de Shaner y Finney (1977):

$$\text{Area bajo la curva} = \sum_{i=1}^n (X_{i+1} + X_i)(t_{i+1} - t_i)/2,$$

donde X = valor de severidad según escala * 10, t es el tiempo desde la inoculación hasta la observación i ésima y n es el número de observaciones.

Esta variable, al integrar los valores de severidad, permite analizar los efectos de los tratamientos sobre el progreso de la enfermedad en el hospedante.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

Los diagnósticos mediante la prueba serológica DAS-ELISA (Clark y Adams, 1977) fueron realizados en el INTA San Pedro y en el Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal del INTA Córdoba y, utilizando antisuero contra TSWV, producido en dicho instituto. Las diferencias de concentración viral se estimaron a partir del valor de absorbancia a 410 nm, medida en el test de ELISA (Király *et al*, 2002). La planta fue considerada ELISA + cuando el nivel de absorbancia a 410 nm fue superior a la del punto crítico (calculado como la media de la absorbancia a 410 nm de los 6 testigos sanos más 3 veces el desvío).

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO

Se midió la altura de la base al ápice de las plantas a los 5, 10 y 15 días de la inoculación, se calculó la tasa de crecimiento relativa como: $\text{TCR} = (\text{cm/día})/\text{altura final}$, para el período evaluado. La materia seca por planta se evaluó secando la biomasa de cada planta en estufa a 65 °C durante 48 horas.

EVALUACIÓN DE PARAMETROS PRODUCTIVOS

Entre los 15 y 20 días de la inoculación las plantas se transplantaron, en un invernadero metálico (9 x 18), sin ventana cenital y con malla anti-insectos (15 x 15 hilos por cm) en

las aberturas, el marco de plantación fue de surcos dobles a 50 cm entre surcos, 1 metro de calle entre ellos y una distancia entre plantas de 0.4 m (Fig 2.3 A, B y C). Se realizaron aplicaciones preventivas para el control de trips con formetanato (200 g/hl), para evitar inoculaciones naturales, las plantas se mantuvieron hasta el final de la cosecha, para obtener datos relativos a la producción. La preparación del suelo, se realizó a base de arado de reja y cincel, se agregó cama de pollo como enmienda orgánica, a razón de 4 kg m², que fue incorporado con sucesivas pasadas de rotocultivador. Durante el cultivo se suministró semanalmente, fertilizantes solubles a través del riego por goteo, a base de nitrato de calcio, nitrato de potasio, triple 15 y sulfato de magnesio, en total se aplicaron 167.23 kg N/ha, 66.5 kg/P/ha, 315.58 kg K/ha, 33.48 kg Ca/ha y 53.57 kg Mg/ha. Se realizaron cosechas semanales de los frutos en estado de madurez comercial, se evaluó el peso total, peso de frutos comerciales grandes (> de 200 g), medianos (200 – 150 g) y pequeño (150 – 100 g) y las causas de descarte por pequeño (< 100 g), deforme y virósico.

DISEÑO ESTADÍSTICO Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Para los tratamientos en condiciones controladas, cada experimento se repitió 3 veces, con 10 plantas por tratamiento y por repetición. Se mostrarán en este capítulo las medias de uno de los experimentos, en el anexo I quedan registrados los análisis de variancias para cada repetición. Una vez aplicados los tratamientos las plantas se distribuyeron en un diseño completamente aleatorizado.

Luego de verificar la normalidad de las variables, se realizó el análisis de la variancia, mediante el procedimiento GLM, del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1993). Las diferencias entre medias fueron analizadas mediante el test de rangos múltiples de Duncan.

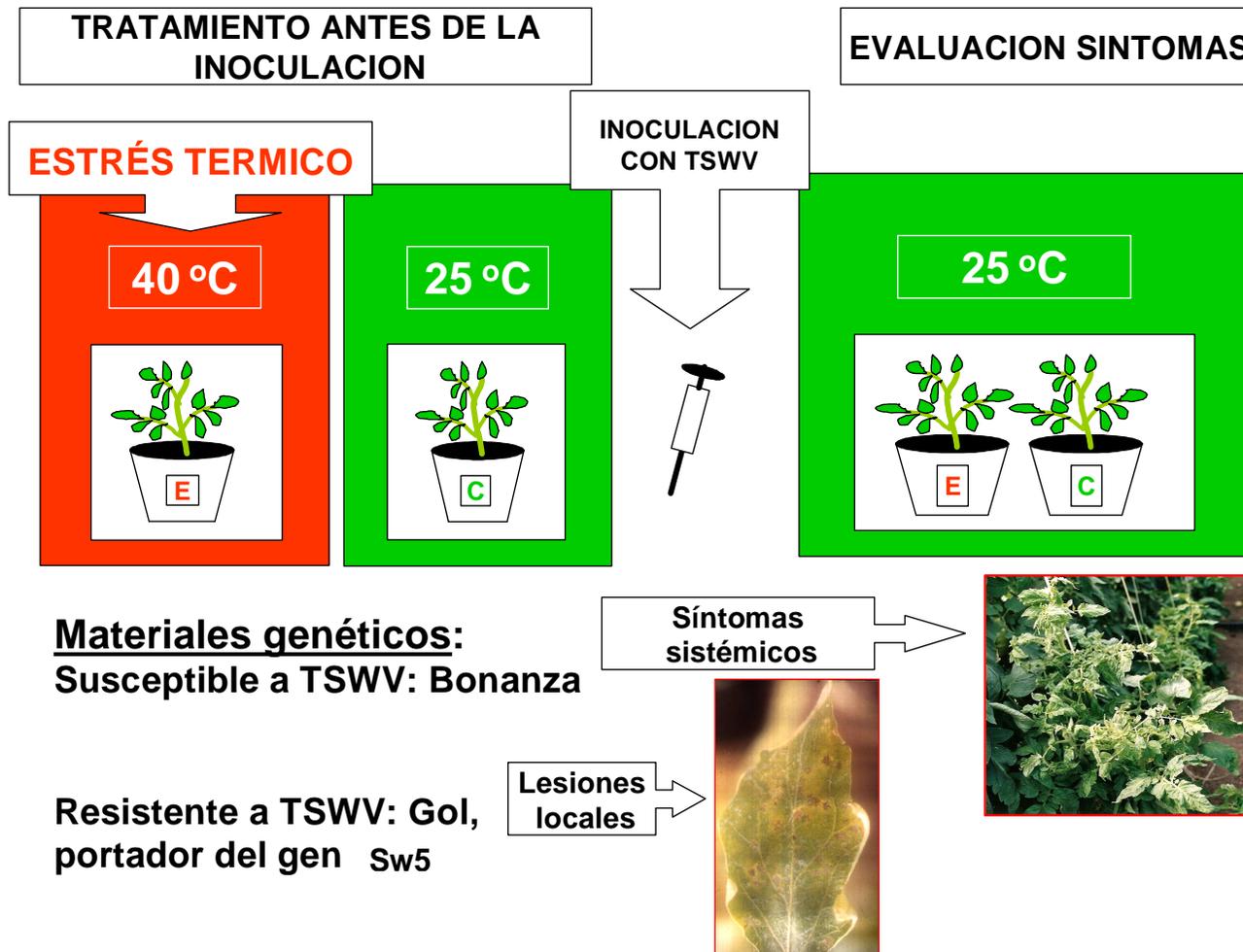


Figura 2. 1 Esquema del sistema experimental desarrollado.

Los tratamientos de estrés se aplicaron antes de la inoculación con una cepa de TSWV. Para los experimentos de dosis de estrés se sometió a las plantas a 40 °C durante 1, 4, 8 y 24 horas antes de la inoculación.

Para evaluar la duración del efecto del estrés térmico las inoculaciones se realizaron 1, 4, 8 y 24 horas después de finalizado el tratamiento de estrés térmico. En el híbrido susceptible se evaluaron síntomas sistémicos y en el resistente, lesiones locales.

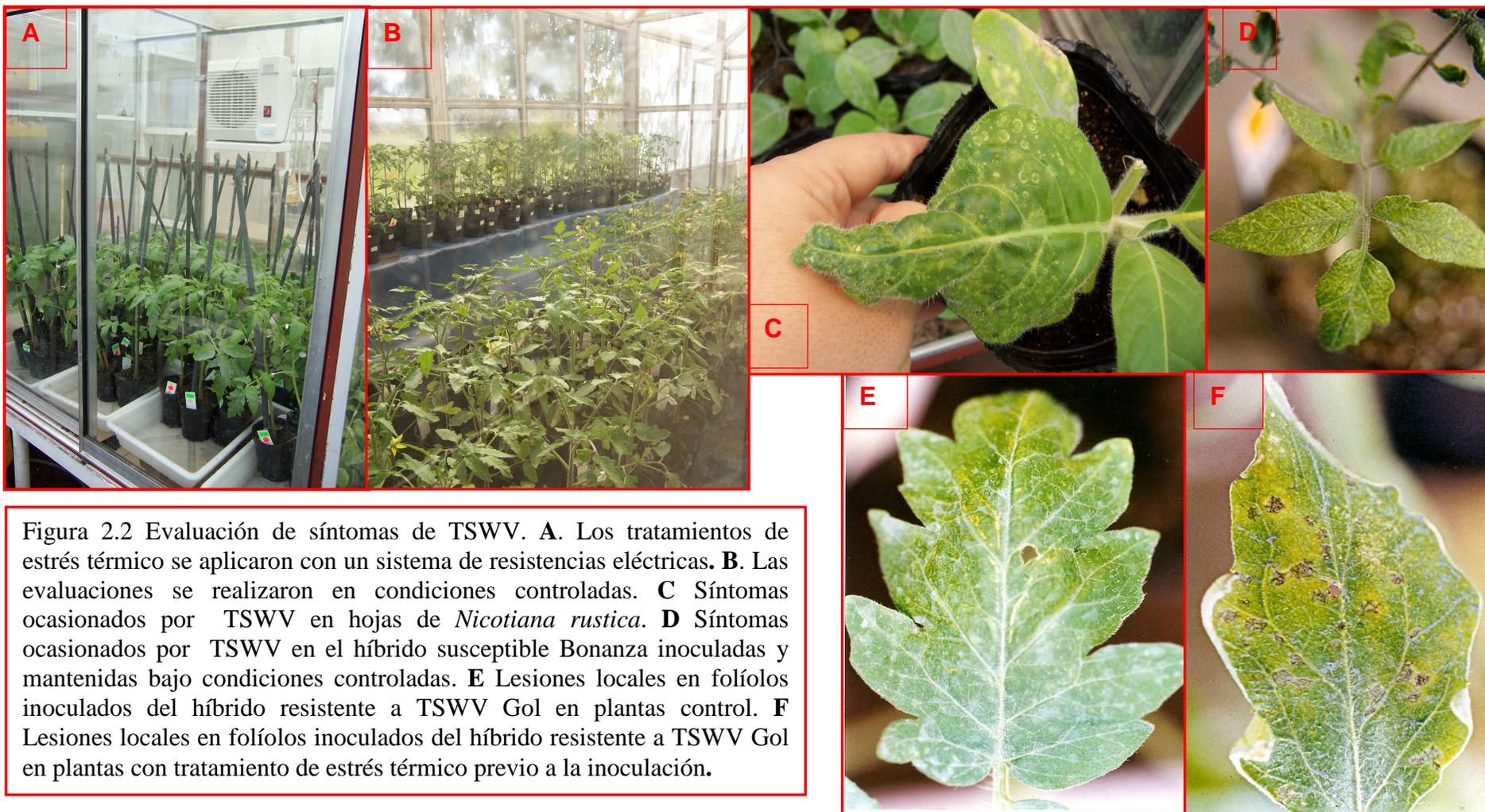




Figura 2.3 Evaluación de parámetros productivos. A y B Para evaluar rendimiento las plantas inoculadas fueron transplantadas en un invernadero con malla antitrips en las aberturas C Síntomas de “peste negra” en frutos de plantas del híbrido Bonanza inoculadas con una cepa de TSWV y transplantadas en un invernadero para evaluar rendimiento.



RESULTADOS

EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA TEMPERATURA DE HOJA Y EL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA EN LOS HÍBRIDOS RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A TSWV

En las figuras 2.4 y 2.5 se observan los cambios en la temperatura foliar así como el contenido relativo de agua medido antes y luego de finalizado los tratamientos de estrés, durante la puesta a punto del sistema experimental.

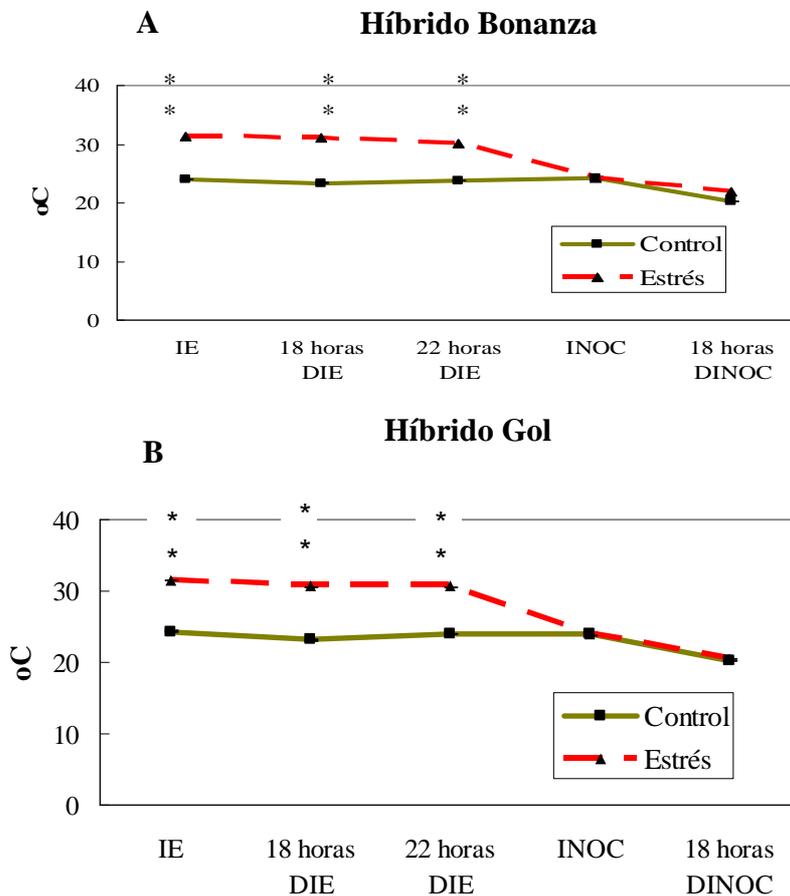


Figura 2.4 Temperatura de hoja a una hora (IE), a 18 y 22 horas de iniciado el estrés (DIE), al momento de inocular (INOC) y 18 horas después de inocular en **A** Híbrido Bonanza y **B** Híbrido Gol.

Estrés = Plantas sometidas a 40 °C durante 24 hs. Control = Plantas sometidas a 25 °C. ** Diferencias altamente significativas ($P < 1\%$) entre plantas estresadas y control.

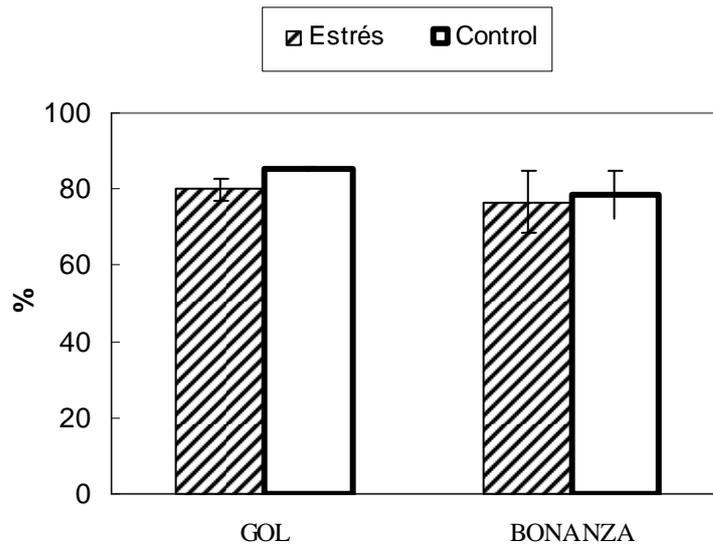


Figura 2.5 Contenido relativo de agua después de finalizado el tratamiento de estrés (24 horas a 40 °C) para los híbridos Gol y Bonanza.

Durante los tratamientos de estrés de 24 horas a 40 °C la temperatura foliar no superó los 35 °C (Figura 2.4 A, B), mientras que en las plantas control se mantuvo alrededor de los 25 °C, estas temperaturas se diferenciaron significativamente ($P < 1\%$) a inicios del estrés y a 18 y 22 horas de iniciado el mismo. Sin embargo, al momento de la inoculación, las plantas sometidas a estrés térmico y las plantas control no diferían en temperatura foliar.

El contenido relativo de agua en plantas sometidas a estrés térmico y control fue similar al momento de la inoculación (Figura 2.5), indicando que las plantas tratadas no estaban en condiciones de déficit hídrico en ese momento.

EFEECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE EL CRECIMIENTO EN LOS HÍBRIDOS RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A TSWV

En las tablas 2.1 y 2.2 se observan las medias para altura, materia seca y tasa relativa de crecimiento a los 5 días de los tratamientos.

Tabla 2.1 Altura (cm) a los 15 días de la inoculación, materia seca total por planta (g/planta) y tasa relativa de crecimiento (cm/día)/altura final). Híbrido Bonanza, susceptible a TSWV.

| | ALT (cm) | MS (g/planta) | TRC (cm/día)/altura final) |
|-----------------|-----------------|----------------------|---|
| Control Sanas | 23.00 ± 0.80 A | 9.46 ± 1.10 A | 0.062 ± 0.003 A |
| Estrés Sanas | 21.44 ± 1.25 A | 5.40 ± 0.60 B | 0.057 ± 0.003 A |
| Control + Virus | 17.68 ± 0.62 B | 2.46 ± 0.17 C | 0.042 ± 0.002 B |
| Estrés + Virus | 13.81 ± 0.84 C | 1.51 ± 0.26 C | 0.032 ± 0.003 C |

Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), Virus= plantas inoculadas con una cepa de TSWV, Control = plantas mantenidas a 25 °C, Sanas= plantas no inoculadas, ALT15= altura a los 15 días de la inoculación, MS= materia seca total por planta, TRC= tasa relativa de crecimiento. Los resultados son medias de uno de los ensayos.

En el híbrido susceptible Bonanza, no se observó un efecto consistente del estrés térmico sobre la altura y la tasa de crecimiento en las plantas sanas, aunque las medias fueron levemente menores para las plantas estresadas. Se observaron diferencias significativas entre plantas estresadas y control para el total de materia seca por planta (Tabla 2.1, Ver Anexo Tabla 2.1). Como se verá más adelante estas diferencias, no se tradujeron en modificaciones en el rendimiento de plantas sanas.

Las plantas inoculadas luego del estrés mostraron menores valores de altura a los 15 días de la inoculación, que las plantas inoculadas sin estrés y que las plantas sanas con y sin estrés (Tabla 2.1 Ver Anexo Tabla 2.1). La tasa de crecimiento relativa también fue menor en estas plantas (Tabla 2.1 Ver Anexo Tabla 2.1). En cuanto a la materia seca total

por planta, las plantas sanas se diferenciaron estadísticamente de las inoculadas ($P < 1\%$) (Ver Anexo Tabla 2.3).

Tabla 2.2 Altura (cm) a los 15 días de la inoculación, materia seca total por planta (g/planta) y tasa relativa de crecimiento (cm/día)/altura final). Híbrido Gol resistente a TSWV.

| | ALT (cm) | MS (g/planta) | TRC (cm/día)/altura final) |
|-----------------|--------------|---------------|----------------------------|
| Control Sanas | 34.00 ± 2.45 | 6.46 ± 0.52 | 0.19 ± 0.021 |
| Estrés Sanas | 32.40 ± 2.07 | 5.67 ± 0.52 | 0.19 ± 0.006 |
| Control + Virus | 33.00 ± 4.24 | 5.99 ± 1.14 | 0.19 ± 0.009 |
| Estrés + Virus | 33.75 ± 2.87 | 4.64 ± 0.58 | 0.19 ± 0.005 |

Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), Virus= plantas inoculadas con una cepa de TSWV, Control = plantas mantenidas a 25 °C, Sanas= plantas no inoculadas, ALT15= altura a los 15 días de la inoculación, MS= materia seca total por planta, TRC= tasa relativa de crecimiento. Se muestran medias de una repetición.

Al igual que en el híbrido Bonanza, en el híbrido Gol el tratamiento de estrés no provocó modificaciones en distintos parámetros de crecimiento evaluados, pero en este caso no se observaron diferencias en plantas inoculadas como se verá más adelante (Tabla 2.2 Ver Anexo Tabla 2.5). En cuanto a la materia seca total por planta, las plantas no inoculadas mostraron mayores valores (Tabla 2.2 Ver Anexo Tabla 2.5).

EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS DE TSWV EN LOS HÍBRIDOS RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A TSWV

En la figura 2.6 se puede observar la evolución de los síntomas sistémicos en el híbrido susceptible Bonanza, así como los días hasta aparición de síntomas. En la tabla 2.3 se observan los resultados de los tests de ELISA desarrollados sobre folíolos inoculados y apicales.

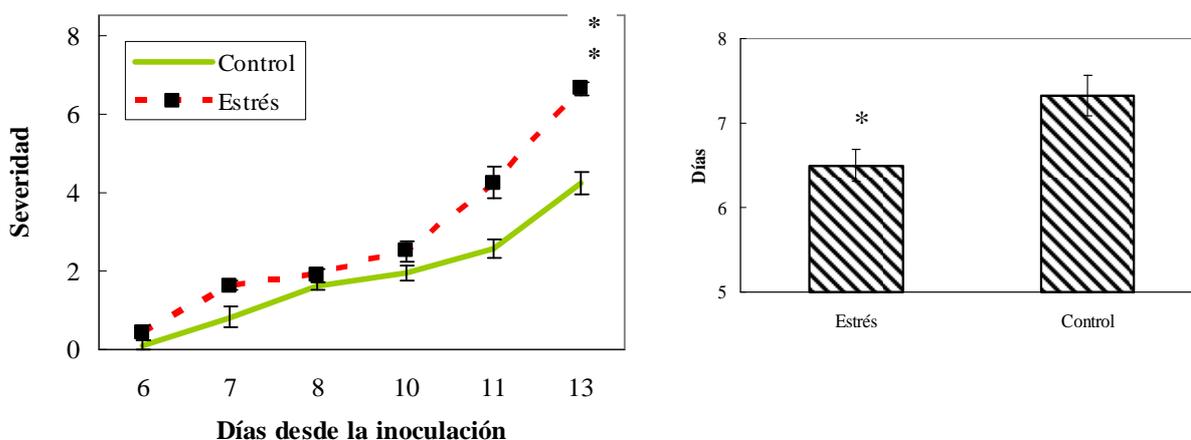


Figura 2.6 Severidad de síntomas sistémicos (izquierda) y días hasta aparición de síntomas (derecha) en plantas sometidas a estrés (24 horas a 40 °C) antes de la inoculación y control. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Se muestran medias de una repetición.

Tratamientos antes de la inoculación con TSWV; Estrés = Plantas sometidas a 40 °C durante 24 hs. Control = Plantas sometidas a 25 °C. Plantas inoculadas una hora después de finalizado el estrés térmico. ** = Significativo con $P < 0.01$ * = Significativo con $P < 0.05$.

Tabla 2.3 Resultados del test de ELISA para TSWV (A_{410}) en el folíolo inoculado y folíolo apical de plantas del híbrido Bonanza, a diversos tiempos desde la inoculación

| | INOC 5 | API 5 | API 10 |
|---------|---------------|--------------|---------------|
| Control | 0.943 ± 0.11 | 0.115 ± 0.02 | 1.819 ± 0.06 |
| Estrés | 1.275 ± 0.06 | 0.202 ± 0.03 | 1.795 ± 0.03 |

INOC5= folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación, API5 y API10= folíolo apical a los 5 y 10 días de la inoculación. Se muestran las medias de una repetición.

En el híbrido susceptible Bonanza, las plantas sometidas a estrés térmico (24 horas a 40 °C) antes de la inoculación manifestaron síntomas sistémicos más severos (Figura 2.6), estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 1\%$) al final de la evaluación

(12 a 13 días de la inoculación) (Ver Anexo Tabla 2.3). Las plantas estresadas manifestaron los síntomas antes que las control (Figura 2.6). Se observó mayor concentración viral (estimada a partir de la absorbancia medida en el test de ELISA) en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación, en esta última la diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 5\%$) (Tabla 2.3) (Ver Anexo Tabla 2.3).

En la figura 2.7 se puede observar la evolución de la aparición de lesiones locales híbrido resistente Gol. En la tabla 2.4 se expresan los resultados de los tests de ELISA desarrollados sobre folíolos inoculados.

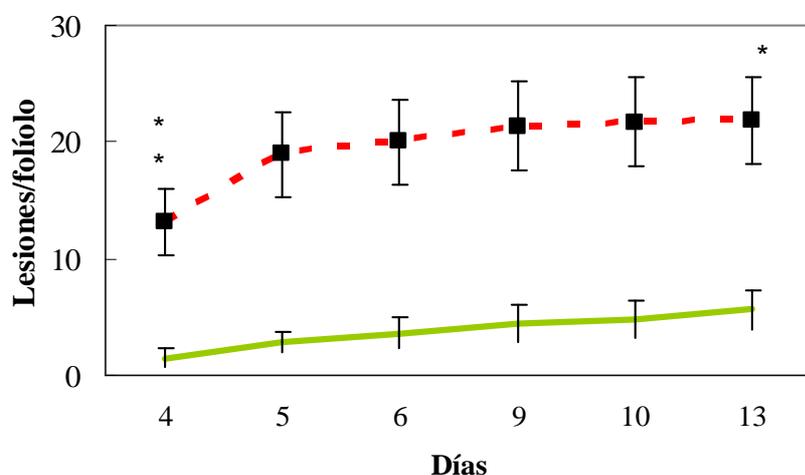


Figura 2.7 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Lesiones locales por folíolo inoculado a distintos días de la inoculación. Híbrido Gol, resistente a TSWV. Se muestran medias de una repetición.

Tratamientos antes de la inoculación con TSWV; Estrés = Plantas sometidas a 40 °C durante 24 hs. Control = Plantas sometidas a 25 °C. Plantas inoculadas una hora después de finalizado el estrés térmico. ** = Significativo con $P < 0.01$, * = Significativo con $P < 0.05$.

Tabla 2.4 Resultados del test de ELISA para TSWV (A_{410}) en el folíolo inoculado del híbrido Gol.

| | |
|---------|-------------------|
| Control | 0.106 ± 0.005 |
| Estrés | 0.202 ± 0.013 |

Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), Control = plantas mantenidas a 25 °C. Se muestran medias de una repetición.

En el híbrido resistente Gol no se observaron síntomas sistémicos luego de la inoculación, las plantas sometidas a estrés térmico antes de la inoculación manifestaron mayor número de lesiones locales en los folíolos inoculados (Figura 2.7). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas a los 4-6 ($P < 1\%$) y 11-13 ($P < 5\%$) días de la inoculación. (Ver Anexo Tabla 2.6). Las plantas estresadas mostraron mayor número de folíolos inoculados muertos ($P < 1\%$) (Ver Anexo Tabla 2.6). Se observó mayor

concentración viral (estimada a partir de la absorbancia medida en el test de ELISA) en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación, estas diferencias fueron estadísticamente significativas. (Tabla 2.4, Ver Anexo Tabla 2.7).

EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO Y LA INOCULACION CON TSWV SOBRE PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN EL HÍBRIDO SUSCEPTIBLE A TSWV

En la figura 2.8 se observan los resultados de los tratamientos sobre parámetros productivos

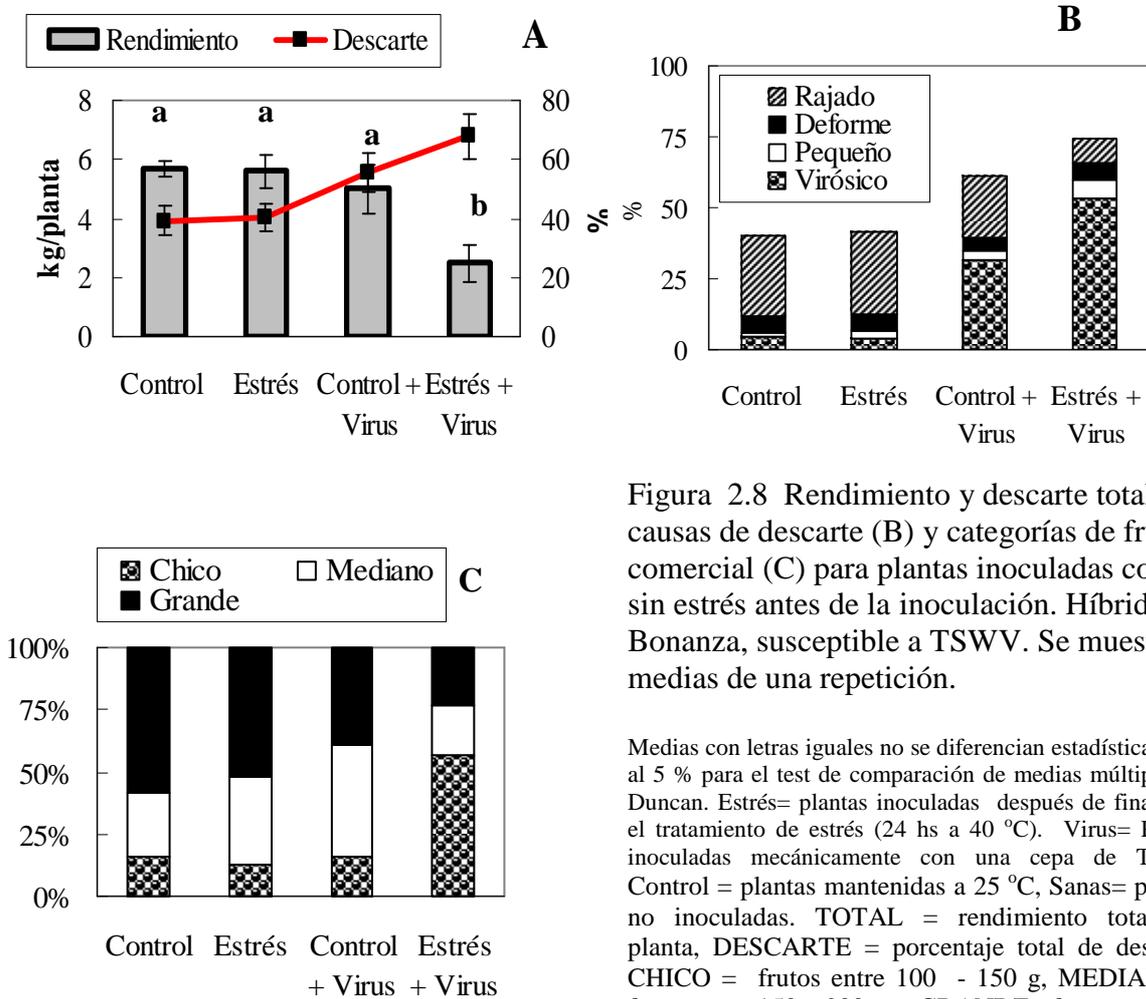


Figura 2.8 Rendimiento y descarte total (A), causas de descarte (B) y categorías de fruto comercial (C) para plantas inoculadas con y sin estrés antes de la inoculación. Híbrido Bonanza, susceptible a TSWV. Se muestran medias de una repetición.

Medias con letras iguales no se diferencian estadísticamente al 5 % para el test de comparación de medias múltiples de Duncan. Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C). Virus= Plantas inoculadas mecánicamente con una cepa de TSWV, Control = plantas mantenidas a 25 °C, Sanas= plantas no inoculadas. TOTAL = rendimiento total por planta, DESCARTE = porcentaje total de descarte, CHICO = frutos entre 100 - 150 g, MEDIANO = frutos entre 150 - 200 g y GRANDE= frutos > 200 g.

Las plantas inoculadas después del estrés mostraron menor rendimiento total (Figura 2.8) y mayor porcentaje de descarte total con respecto a las inoculadas sin estrés, ($P < 5\%$)

siendo los frutos virósicos la mayor causa de descarte (Figura 2.8) (Ver Anexo Tabla 2.4). Los frutos comerciales de las plantas estresadas antes de la inoculación presentaron mayor porcentaje de frutos comerciales pequeños ($P < 1\%$) (Ver Anexo Tabla 2.4). En las plantas sanas, no se observaron diferencias en cuanto al descarte total y sus causas como consecuencia del estrés aplicado.

DETERMINACIÓN DE LAS HORAS DE ESTRÉS TÉRMICO NECESARIAS PARA MODIFICAR LA PREDISPOSICIÓN A TSWV EN LOS HÍBRIDOS RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A TSWV

Se realizaron experimentos para determinar cuántas horas de estrés térmico previas a la inoculación, son necesarias para modificar la predisposición a TSWV, en cultivares de tomate resistentes y susceptibles a la enfermedad. En la figura 2.9 se observa el efecto de la aplicación de distintas horas de estrés termico sobre la expresión de síntomas sistémicos de TSWV en el híbrido susceptible Bonanza.

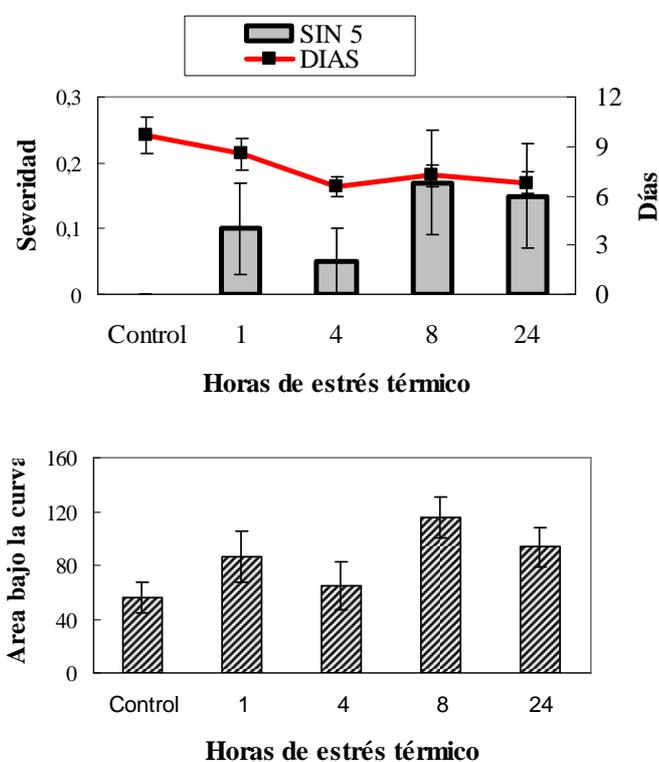


Figura 2.9 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación.

Arriba: severidad de síntomas sistémicos en el híbrido susceptible a 5 días de la inoculación y días desde la inoculación hasta aparición de síntomas.

Abajo: área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

Se muestran medias de una repetición.

Plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés (40 °C) y control (25 °C). Área bajo la curva de progreso de la enfermedad = se calculó según una ecuación que utiliza los valores de severidad tomados durante los 15 días posteriores a la inoculación.

En el híbrido susceptible la mayor predisposición se observó a partir de 1 hora de aplicación del estrés, este efecto se manifestó como aumento en la severidad de síntomas sistémicos a los 5 días de la inoculación y mayores valores de área bajo la curva de la enfermedad (Figura 2.9).

Los datos obtenidos indican que el estrés térmico afectó la respuesta temprana de la planta luego de la inoculación con TSWV y esto se manifestó luego en el progreso de la enfermedad. El análisis de variancia general, mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 1\%$) para severidad de síntomas a los 5 días de la inoculación y área bajo la curva de la enfermedad y para días hasta aparición de síntomas ($P < 5\%$) (Ver Anexo Tablas 2.8.1 y 2.8.2).

En la figura 2.10 se observa el efecto de la aplicación de distintas horas de estrés térmico sobre la expresión de lesiones locales del híbrido resistente Gol así como los resultados de los tests de ELISA realizados sobre folíolos inoculados y apicales.

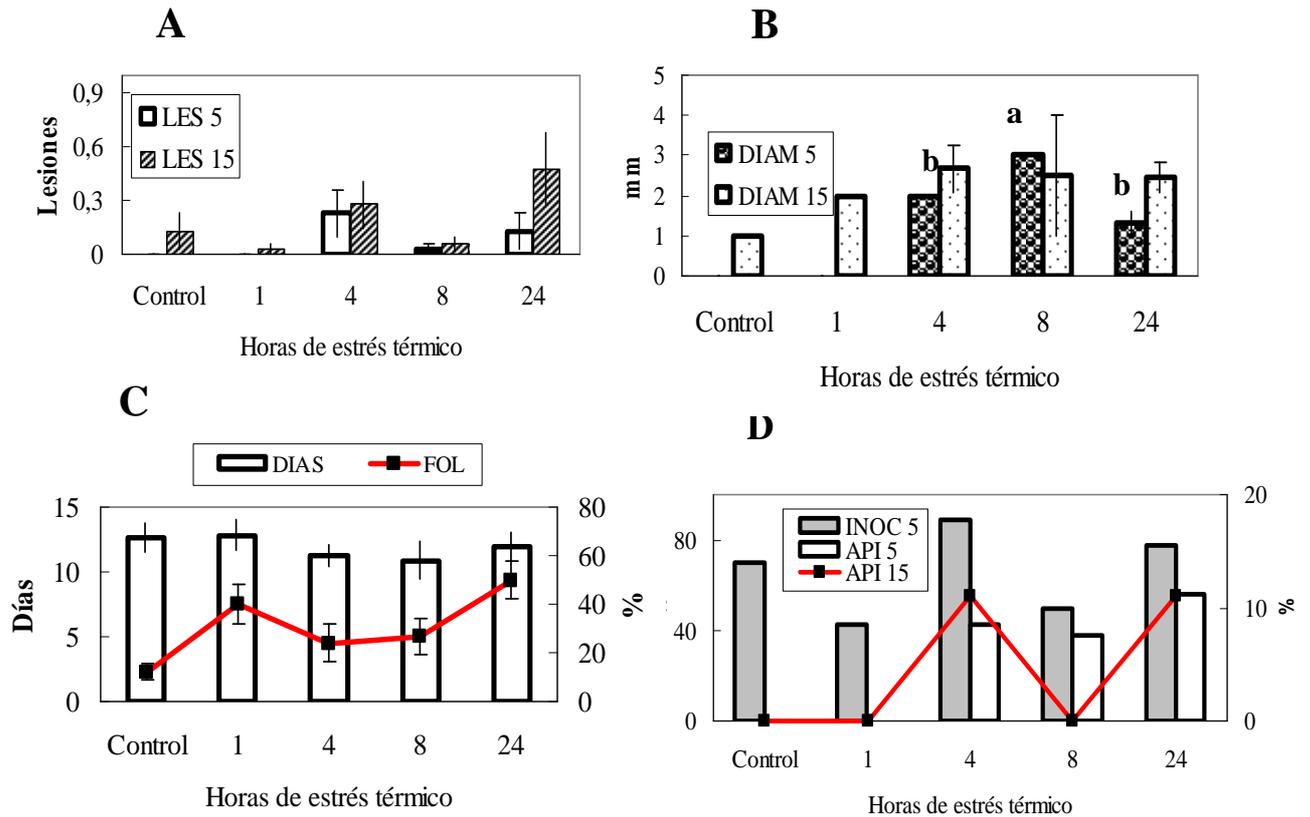


Fig 2.10 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. **A** Lesiones locales por folíolo inoculado. **B** Diámetro de las mismas. **C** Días desde la inoculación hasta aparición de lesiones locales y porcentaje de folíolos con lesiones. **D**. Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Porcentaje de ELISA positivos en el folíolo inoculado (INOC 5) y apical (API 5 y 15). Híbrido Gol resistente a TSWV. Se muestran las medias de una repetición.

Plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). Híbrido resistente Gol. Medias con letras iguales no difieren entre sí al 5 % para el test de medias múltiples de Duncan.

En el híbrido resistente el efecto predisponente del estrés térmico, se observó a partir de 4 horas de aplicado el mismo. Esto se evidenció como mayor número de lesiones locales y diámetro de las mismas en el folíolo inoculado, así como mayor concentración viral en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación. No se observaron síntomas sistémicos en ningún caso. Las lesiones locales observadas se interpretaron como áreas de tejido necrosadas, como respuesta del gen de resistencia del hospedante a la infección viral. El mayor número y diámetro de las mismas, así como la detección del patógeno a través del test de ELISA, serían producto de un atraso en la capacidad del tejido del hospedante de manifestar estas reacciones de resistencia (Figura 2.10) (Ver Anexo Tablas 2.9.1, 2.9.2 y 2.10).

DURACIÓN DEL EFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA PREDISPOSICIÓN A TSWV EN LOS HÍBRIDOS RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE

Para determinar la duración del efecto predisponente a TSWV que provoca el estrés térmico, se utilizó la dosis de estrés térmico (24 horas a 40 °C), que más efecto tuvo sobre la susceptibilidad a TSWV en ambos cultivares. En la figura 2.11 se observa los resultados de los tratamientos sobre la manifestación de síntomas sistémicos de TSWV en el híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

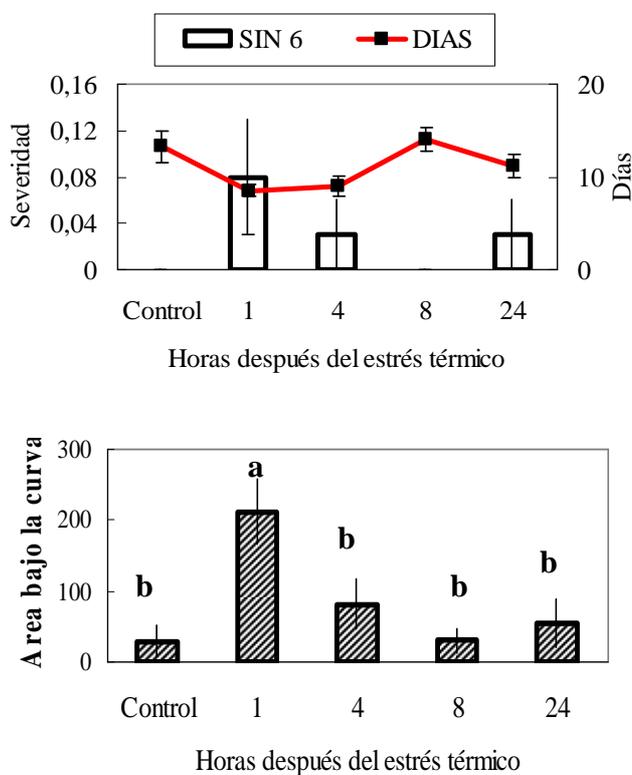


Figura 2.11 Duración del efecto del estrés térmico.

Arriba: severidad de síntomas sistémicos a los 6 días de la inoculación y días hasta aparición de síntomas.

Abajo: Área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Se muestran medias de una repetición.

Plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 horas después de finalizado el estrés térmico (24 horas a 40 °C) y control (25 °C).

En el cv Bonanza, las plantas inoculadas 1 y 4 horas después de finalizado el estrés manifestaron síntomas sistémicos más severos a los 13 y 6 días de la inoculación (Figura 2.11) y mayores valores de área bajo la curva de la enfermedad. (Figura 2.11). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 1\%$) para la variable área bajo la curva de progreso de la enfermedad (Ver Anexo Tabla 2.11), se observó un adelanto en la aparición de síntomas sistémicos en plantas inoculadas 1 hora después del tratamiento de estrés ($P < 1\%$) (Figura 2.11, Ver Anexo Tabla 2.11).

En la figura 2.12 se observa los resultados de los tratamientos sobre la aparición de lesiones locales en el híbrido resistente Gol.

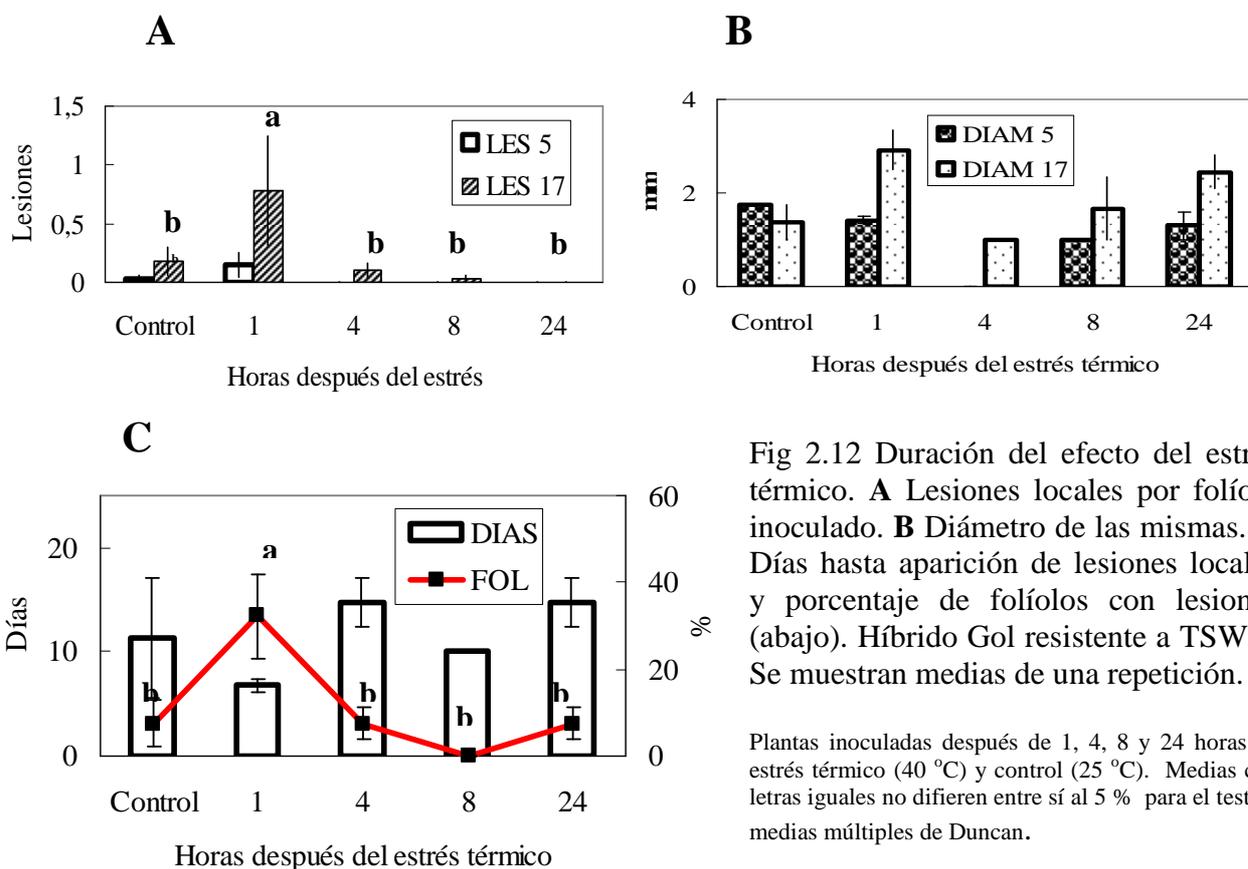


Fig 2.12 Duración del efecto del estrés térmico. **A** Lesiones locales por folíolo inoculado. **B** Diámetro de las mismas. **C** Días hasta aparición de lesiones locales y porcentaje de folíolos con lesiones (abajo). Híbrido Gol resistente a TSWV. Se muestran medias de una repetición.

Plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). Medias con letras iguales no difieren entre sí al 5 % para el test de medias múltiples de Duncan.

En este híbrido las plantas inoculadas una hora después del estrés, manifestaron mayor número de lesiones locales y mayor diámetro de las mismas a 17 - 20 días de la inoculación, menor número de días hasta la aparición de lesiones locales y mayor porcentaje de folíolos inoculados con lesiones locales (Figura 2.12).

El efecto del estrés térmico fue estadísticamente significativo ($P < 5\%$) para el número de lesiones locales a los 17-20 días de la inoculación (Ver Anexo Tablas 2.12.1 y 2.12.2).

DISCUSION

EFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y PARAMETROS PRODUCTIVOS EN LOS HÍBRIDOS RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A TSWV

En el híbrido susceptible el estrés térmico (24 horas a 40 °C), no afectó de manera significativa la altura y la tasa de crecimiento en las plantas sanas, aunque las medias fueron levemente menores para las plantas estresadas. Se observaron diferencias significativas entre plantas estresadas y control para el total de materia seca por planta pero estas diferencias, no se tradujeron en modificaciones en el rendimiento de plantas sanas. Las plantas inoculadas luego del estrés mostraron menores valores de altura a los 15 días de la inoculación, que las plantas inoculadas sin estrés y que las plantas sanas con y sin estrés. La tasa de crecimiento relativa también fue menor en estas plantas, este efecto sería consecuencia del tratamiento previo a la inoculación sobre la expresión de síntomas, dado que la reducción de la altura es una de las consecuencias de la infección viral sobre el hospedante.

Las plantas inoculadas después del estrés (24 horas a 40 °C) mostraron menor rendimiento total y mayor porcentaje de descarte total con respecto a las inoculadas sin estrés, siendo los frutos virósicos la mayor causa de descarte. Los frutos comerciales de las plantas estresadas antes de la inoculación presentaron mayor porcentaje de frutos pequeños. En las plantas sanas, no se observaron diferencias en cuanto al descarte total y sus causas como consecuencia del estrés térmico aplicado antes de la inoculación.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Díaz-Pérez *et al.*, (2007), quienes encontraron que el aumento en temperatura en los tejidos del hospedante, más

específicamente la raíz; disminuía el tiempo en que el cultivo estaba libre de TSWV y esto se traducía en menor peso de la biomasa aérea y rendimiento.

En el híbrido resistente, la tasa de crecimiento relativa no fue modificada por los tratamientos de estrés (24 horas a 40 °C) o por la inoculación. No se observó efecto consistente del estrés térmico sobre la altura y la tasa de crecimiento, en cuanto a la materia seca total por planta, las plantas no inoculadas mostraron mayores valores.

EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA EXPRESION DE SINTOMAS DE TSWV

A) En una interacción planta patógeno compatible

En el híbrido susceptible las plantas sometidas a estrés térmico (24 horas a 40 °C) antes de la inoculación manifestaron síntomas sistémicos más severos, que fueron observados antes que en las plantas control y mayor concentración viral (estimada a partir de la absorbancia medida en el test de ELISA) en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación. El aumento en la predisposición se registró a partir de 1 hora de aplicación del estrés, este efecto se manifestó como aumento en la severidad de síntomas sistémicos a los 5 días de la inoculación y mayores valores de área bajo la curva de la enfermedad. En cuanto a la duración de este efecto, las plantas inoculadas hasta 4 horas después de finalizado el estrés manifestaron síntomas sistémicos más severos a los 13 y 6 días de la inoculación y mayores valores de área bajo la curva de la enfermedad.

Los datos obtenidos indicarían que el estrés térmico afectó la respuesta temprana de la planta luego de la inoculación con TSWV y esto se manifestó luego en el progreso de la enfermedad. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en otras interacciones planta-patógeno compatibles como Brakke y Samson (1981), para la interacción maíz-WSMV, quienes encontraron que algunas líneas eran más susceptibles a WSMV a 35 °C que a 25 °C; aunque los mismos autores en la interacción planta-patógeno, maíz-BSMV encontraron que el cultivo era más susceptible a BSMV si las plantas eran mantenidas a 25 °C en lugar de 35 °C luego de la inoculación. Según estas observaciones,

el efecto de la temperatura sobre la predisposición del hospedante a patógenos de origen viral podría depender de cada interacción planta hospedante.

También existen coincidencias con los resultados obtenidos por Llamas-Llamas *et al.* (1998), quienes registraron mayor severidad de síntomas en plantas de *Nicotiana tabacum* cv. White Burley, *Datura stramonium* y *Physalis ixocarpa* mantenidas a alta temperatura e inoculadas con TSWV y mayor acumulación de virus en distintos tejidos de la planta de tabaco, salvo en las hojas inoculadas, donde la concentración fue mayor a bajas temperaturas, este último resultado no coincide con los obtenidos en el presente estudio, ya que se encontró mayor concentración viral en el folíolo inoculado.

Díaz-Pérez *et al.*, (2007), también encontraron que el aumento en temperatura en los tejidos del hospedante, más específicamente la raíz, redujo el tiempo en que las plantas se mantuvieron libres del patógeno bajo dos sistemas de infección: inoculación artificial y natural. Este tiempo fue mayor en los tratamientos que lograron mantener menor temperatura radicular utilizando distintos colores de mulch. Este último efecto podría haber afectado a la población del vector, por lo que es difícil en este trabajo separarlo de la alteración sobre la temperatura de la raíz y el aumento en la predisposición del hospedante, aunque las plantas inoculadas artificialmente respondieron de la misma manera que aquellas sometidas a inóculo natural.

B) En una interacción planta patógeno incompatible

Las plantas sometidas a estrés térmico (24 horas a 40 °C) antes de la inoculación manifestaron mayor número de lesiones locales en los folíolos inoculados y mayor número de folíolos inoculados muertos. Se observó mayor concentración viral (estimada a partir de la absorbancia medida en el test de ELISA) en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación, estas diferencias fueron estadísticamente significativas. El efecto predisponente del estrés térmico, se observó a partir de 4 horas de aplicado el mismo. Esto se evidenció como mayor número de lesiones locales y diámetro de las mismas en el folíolo inoculado, así como mayor concentración viral en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación.

Las plantas inoculadas una hora después del estrés, manifestaron mayor número de lesiones locales y mayor diámetro de las mismas a 17 - 20 días de la inoculación, menor número de días hasta la aparición de lesiones locales y mayor porcentaje de folíolos inoculados con lesiones locales.

Los resultados expuestos en esta tesis, coinciden con los obtenidos anteriormente por otros investigadores en décadas pasadas en lo que respecta a aumentos en predisposición al aumentar la temperatura en la que se encuentran los tejidos del hospedante. Best (1936) encontró que TMV en *Nicotiana glutinosa* y TSWV en *Nicotiana tabacum* producían un 30 % más de lesiones si la temperatura ambiente era elevada de 15 a 20 °C (citado por Kassanis, 1952). Kassanis (1952), en distintas interacciones virus hospedante (poroto-TNV, *N. glutinosa*-TMV, *N. glutinosa*-TBSV, tobacco-TSWV) obtuvo aumento de lesiones necróticas en plantas inoculadas después de la aplicación de estrés térmico. Específicamente en *Nicotiana tabacum* inoculado con TSWV, 6 horas de estrés (temperatura ambiente a 36 °C) ocasionaron un efecto similar que la aplicación de 24 y 48 horas de estrés. En estos estudios el efecto observado fue inverso cuando el estrés fue aplicado después de la inoculación.

Otros autores encontraron mayor número de plantas de *N. glutinosa* infectadas con CVA cuando éstas fueron mantenidas a 28 °C antes de la inoculación, con respecto de aquellas mantenidas a 20 °C y mayor concentración de virus en los tratamientos postinoculación a 28 °C que a 20 °C (Gonzalez y Pound, 1963; Pound y Walter, 1945 y Pound y Weathers, 1953; estos dos últimos citados por Gonzalez y Pound, 1963).

Resultados coincidentes con esta tesis a pesar de que la metodología utilizada es distinta, ya que el estrés fue aplicado sumergiendo las hojas de 20 a 40 segundos en agua a 50 °C, son los obtenidos por Helms y Mc Intyre (1964), en la interacción *Phaseolus vulgaris* L.-TMV, en la cual el tratamiento de estrés térmico aplicado 6 y 4 horas antes de la inoculación produjo un mayor número de lesiones que los tratamientos más cercanos a la inoculación (2-0.8 horas), el diámetro de lesiones también aumentó como resultado del estrés térmico pero no con la misma tendencia. Yarwood (1958), aplicó estrés térmico

después de la inoculación con TSWV a hojas de pepino y observó un aumento en el número de lesiones y en el tamaño de éstas, lo mismo observó en poroto y caupí inoculados con TMV, TRSV, PYBMV o AMV. Los resultados se atribuyeron a daños ocasionados por las altas temperaturas sobre tejidos del hospedante.

Con la misma técnica Wu *et al.*, (1969), trataron hojas de poroto (*Phaseolus vulgaris*, L.), antes de la inoculación con TMV, como resultado encontraron mayor número de lesiones y mayor tamaño de éstas, en función de la dosis de calor aplicada. El tratamiento post inoculación, tuvo el mismo resultado con una disminución de la tasa de deposición de calosa, y una correlación positiva entre el tamaño de las lesiones y la deposición de este compuesto en las células sanas vecinas. La infectividad del virus extraído de las lesiones de las hojas estresadas, guardó relación con la dosis de estrés aplicado.

Otros trabajos que aportan coincidencias son los de Tu (1989), quien encontró que la temperatura post inoculación altera el desarrollo de necrosis ocasionada en poroto por BYMV, el porcentaje de plantas que desarrollaron síntomas y la concentración viral aumentó de 16 a 24 °C pero disminuyó de 24 a 28 °C y los de Zheng (2005), este autor observó aumento en la incidencia de necrosis apicales causadas por SMV en plantas de soja mantenidas a temperaturas crecientes de 10 a 30 °C después de la inoculación.

En los experimentos expuestos en este capítulo que involucraron al híbrido resistente Gol, no se observaron síntomas sistémicos como resultado de los tratamientos aplicados. Las lesiones locales observadas se interpretan como áreas de tejido necrosadas, como respuesta del gen de resistencia del hospedante a la infección viral en coincidencia con otros autores que relacionaron el mayor desarrollo en lesiones locales con dificultades en la expresión de genes de resistencia. El mayor número y diámetro de las mismas, así como la detección del patógeno a través del test de ELISA, serían producto de un atraso en la capacidad del tejido del hospedante de manifestar estas reacciones de resistencia. Otros investigadores en otro tipo de interacciones sí observaron aparición de síntomas sistémicos en lugar de reacciones localizadas como resultado de la aplicación de estrés térmico. Samuel (1931), citado por Kassanis, 1952) encontró, que el virus del mosaico del tabaco, producía lesiones cloróticas y moteados sistematizados cuando *Nicotiana glutinosa* era

mantenida a 35 °C, en lugar de las lesiones necróticas localizadas que se producían a temperaturas más bajas; por otra parte, Hutton y Peak (1952), citados por Finley (1953), encontraron que en algunos materiales resistentes, la eficiencia en desactivar a TSWV variaba considerablemente con la temperatura. Yarwood (1958) observó la aparición de infecciones sistémicas en lugar de infecciones locales en las interacciones poroto-TSWV y pepino-TMV.

Raskin (1992) encontró que plantas de tabaco resistentes, inoculadas con TMV desarrollaron infecciones sistémicas a 32 °C. Valkonen y Watanabe (1999), encontraron que el gen de resistencia al virus del mosaico de pepino (CMV) en papa no se expresa a 28 °C y sí a 18 °C y que algunos genotipos de papa que expresan el gen dominante de resistencia a PVY, pierden esta condición a altas temperaturas. Moury *et al.* (1998), observaron que la resistencia a TSWV conferida por el gen Tsw en pimiento es menos estable a 32 °C que a 22 °C.

La duración del tratamiento de altas temperaturas, que aumentó la susceptibilidad en otros estudios fue variable, 4 días a 36 °C (Kassanis, 1952) o un segundo a 55 °C (Yarwood, 1956). En cuanto a la duración de esta predisposición por temperatura, ésta varió de 15 minutos en porotos a 10 °C (Panzer, 1958), 3 días en la misma especie expuesta 10 segundos a 50 °C (Yarwood, 1956, citado por Yarwood, 1976) e inoculada con el virus del mosaico del tabaco, hasta 24 días en caña de azúcar expuesta al calor e inoculada con el virus del mosaico de la caña de azúcar (Benda, 1971), todos citados por Yarwood (1976). De todos estos antecedentes el más comparable por la metodología utilizada con el trabajo realizado en esta tesis es el de Kassanis (1952), la duración del efecto de estrés fue menor a la obtenida por el citado autor, en este estudio la duración fue de 1 hora para el híbrido resistente Gol y 4 horas para el híbrido susceptible Bonanza. Estas diferencias podrían deberse a la naturaleza del estrés aplicado, en esta tesis la temperatura de la hoja no superó los 35 °C y las plantas no sufrieron estrés hídrico, otro factor determinante de las diferencias puede ser el material genético utilizado. En resumen, es difícil establecer si realmente las condiciones en que se llevaron a cabo los experimentos son comparables para analizar las diferencias en la caracterización de la reacción, pero sí

es válido el resultado general en cuanto a los aumentos en predisposición observados por someter al hospedante a altas temperaturas antes de la inoculación.

El aumento en la infección provocada por la aplicación de estrés térmico al hospedante antes de la misma, ha sido observada en numerosas interacciones planta patógeno que involucran a virus (Yarwood, 1976), en cambio los efectos de los tratamientos post inoculación, han sido diversos y dependientes de la duración e intensidad del estrés aplicado y del momento de la aplicación con respecto a la inoculación (Goodman *et al.*, 1986). Si bien ninguno de los antecedentes mencionados puede utilizarse en comparación directa con el estudio presentado en esta tesis ya que los tratamientos no se realizaron con la misma metodología o rango de temperaturas, se podría concluir que el efecto del estrés térmico aplicado antes de la inoculación sobre la infección viral en interacciones compatibles e incompatibles depende de cada interacción planta-patógeno y que cuando esta interacción involucra a tomate y TSWV el aumento en la temperatura favorece la infección viral y el establecimiento del patógeno en los tejidos inoculados, esto se traduce en una mayor severidad de síntomas sistémicos si el hospedante es susceptible y un atraso en la expresión del gen de resistencia manifestado a través de un mayor número de lesiones y tamaño locales cuando el hospedante es portador del gen de resistencia Sw5.

CONCLUSIONES PARCIALES

En el híbrido susceptible Bonanza, no se observó un efecto consistente del estrés térmico sobre la altura y la tasa de crecimiento en las plantas sanas, pero sí en las plantas inoculadas, como consecuencia de la alteración en la expresión de síntomas. Al igual que en el híbrido Bonanza, en el híbrido Gol el tratamiento de estrés no provocó modificaciones en distintos parámetros de crecimiento evaluados en plantas sanas ni inoculadas.

En el híbrido susceptible Bonanza, las plantas sometidas a estrés térmico (24 horas a 40 °C) antes de la inoculación manifestaron síntomas sistémicos más severos, éstos se manifestaron antes que en las plantas control. En el híbrido resistente Gol no se observaron

síntomas sistémicos luego de la inoculación, las plantas sometidas a estrés térmico antes de la inoculación manifestaron mayor número de lesiones locales en los folíolos inoculados y mayor número de folíolos inoculados muertos.

En ambos híbridos se observó además en el tratamiento de estrés, mayor concentración viral (estimada a partir de la absorbancia medida en el test de ELISA) en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación.

En el híbrido susceptible la mayor predisposición se observó a partir de 1 hora de aplicación del estrés, este efecto se manifestó como aumento en la severidad de síntomas sistémicos a los 5 días de la inoculación y mayores valores de área bajo la curva de la enfermedad. En el híbrido resistente el efecto predisponente del estrés térmico, se observó a partir de 4 horas de aplicado el mismo. Esto se evidenció como mayor número de lesiones locales y diámetro de las mismas en el folíolo inoculado, así como mayor concentración viral en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación.

En cuanto a la duración del efecto del estrés, en el híbrido Bonanza, las plantas inoculadas hasta 4 horas después del mismo manifestaron síntomas sistémicos más severos y mayores valores de área bajo la curva de la enfermedad. En el híbrido resistente el efecto del estrés duró una hora, las plantas inoculadas en ese período manifestaron mayor número y diámetro de lesiones locales, menor número de días hasta la aparición de las mismas y mayor porcentaje de folíolos inoculados con lesiones locales.

EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE LA PREDISPOSICIÓN A LA INFECCIÓN CON TSWV Y SOBRE EL CRECIMIENTO Y PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN PLANTAS DE TOMATE RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES AL VIRUS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS Y BAJO PRESION DE INOCULO NATURAL

INTRODUCCIÓN

El ácido salicílico (AS) cumple un importante rol en la resistencia al estrés de origen abiótico (Dat *et al.*, 1998 a y b; Dat *et al.*, 2000; Janda *et al.*, 2005; Wang y Li, 2005; Senaratna *et al.*, 2000; Szepesi *et al.*, 2005) y está involucrado en la transmisión de señales de defensa (Ryals *et al.*, 1996; Gaffney *et al.*, 1993) y la resistencia a enfermedades (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*; 1997; Thulke y Conrath, 1998).

En interacciones hospedante-patógeno incompatibles, la reacción hipersensible es un evento clave en el inicio de la manifestación de las reacciones de defensa. La explosión oxidativa, es una rápida respuesta que desarrollan las plantas que pueden generar una reacción hipersensible, cuando son inoculadas con patógenos y precede a la acumulación local y sistémica de AS (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Después del primer trabajo publicado por White (1979), quien descubrió que aplicaciones externas de AS previas a la inoculación con TMV lograron reducir el número y tamaño de las lesiones en *N. tabacum*, el rol del contenido endógeno de esta molécula en el proceso de iniciación de la respuesta sistémica adquirida (RSA) fue extensamente estudiado en pepino y tabaco. En ambas especies se encontró acumulación de AS precediendo la aparición de marcadores moleculares de RSA luego de la inducción (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Yalpani *et al.* (1991), observaron que las hojas de tabaco resistente inoculado con TMV, desarrollaban menor número de lesiones si se las trataba con AS. Efectos similares

lograron también Yalpani *et al.* (1993), aplicando precursores de AS, como el ácido benzoico y cinámico. También se observó que los niveles de AS aumentaron más de 50 veces en el cv de tabaco resistente, pero no en el susceptible al inocular con TMV (Malamy *et al.*, 1990). Silverman *et al.*, (2005), evaluaron la capacidad de iniciar RSA, de 47 derivados del salicilato y encontraron una alta correlación entre la inducción de PR-1a y la inducción de resistencia a TMV.

Mur *et al.* (1997), realizaron estudios en plantas transgénicas de tabaco, que no pueden acumular AS desde etapas tempranas de la formación de la lesión y encontraron mayores tasas de crecimiento de lesiones, así como también partículas de TMV, en áreas asintomáticas. Según los autores, la respuesta de la planta de tabaco portadora del gen N de resistencia a TMV se podría dividir en tres etapas: una fase inicial preneocrótica caracterizada por la explosión oxidativa y la inducción de genes de enzimas de la vía del fenilpropano y la síntesis de bajos niveles de AS, una segunda fase de expansión de las lesiones, síntesis de AS y detección de proteínas relacionadas con la patogénesis alrededor de las lesiones y una tercera etapa en que las lesiones comienzan a ser limitadas y comienza a exhibirse RSA, el rol principal del ácido salicílico estaría dado en la fase preneocrótica. La alteración de la acumulación de AS en la explosión oxidativa inicial, aumentaría la dispersión viral y retrasaría la muerte de tejidos durante el establecimiento de la lesión.

Altos contenidos de AS fueron encontrados en los tejidos de plantas infectadas con diferentes patógenos, por ejemplo, en el floema de plantas de pepino luego de la infección por *Colletotrichum* (Metraux *et al.*, 1990). Jeun *et al.* (2000), probaron en plantas de tomate dos inductores de resistencia: pretratamientos con ácido DL-3-aminobutírico y preinoculación con tobacco necrosis virus (TNV) y hallaron altos contenidos de ácido salicílico en las hojas tratadas. Hammond-Kosack *et al.* (1996), detectaron un pico de ácido salicílico a las 12 horas de inyectar cotiledones de tomate con fluidos intercelulares de *Cladosporium fulvum*; los cvs utilizados portaban los genes Cf-9 y Cf-2 que confieren resistencia a este patógeno. Rasmussen *et al.* (1991), encontraron altas concentraciones de AS en el floema de pecíolos de hojas de pepino inoculadas con *Pseudomonas syringae* patovar *syringae*.

Trabajos recientes han abordado los efectos del AS sobre la biología celular de la infección viral. Zhang *et al.* (2004), estudió el rol de la acumulación de AS en la respuesta de hipersensibilidad y resistencia sistémica adquirida de tabaco inducida por el elicitor PB90 secretado por *Phytophthora boehmerial*. Este elicitor indujo RH en mutantes NahG que no acumulan AS, por lo que los autores concluyeron que esta reacción puede estar mediada por una vía independiente del AS. Sin embargo PB90 aumentó la resistencia y acumulación de PR-1 en el silvestre pero no en el mutante deficiente en AS. Los autores concluyeron que el AS podría actuar como un primer mensajero en la inducción de RSA, pero no de RH siendo esta última una respuesta directa de la infección por patógenos.

En otros estudios que utilizaron plantas de *Phaseolus vulgaris* el tratamiento con AS 1 mM, inhibió parcialmente la acumulación de “white clover mosaic virus” en las hojas infectadas. También se observó que el AS aumentó la expresión de la enzima fenil amonio liasa (PAL), NPR-1, PR-1 y Hsp70, genes relacionados con la resistencia a patógenos (Galis *et al.*, 2004). Murphy y Carr, (2002) observaron en tabaco que los tratamientos con AS, restringieron a la célula epidérmica el movimiento viral a partir del sitio de infección con TMV, pero no con CMV. También observaron que el AS, no inhibe el movimiento de TMV disminuyendo el tamaño del límite de exclusión de los plasmodesmos, pero que inhibe la replicación viral en los protoplastos del mesófilo.

El AS puede también inducir resistencia a virus en plantas que no tienen un gen de resistencia, esto ocurre en ausencia de muerte celular y se traduce en reducción de la cantidad de virus en el tejido infectado y retraso en la aparición de síntomas (White *et al.*, 1983; Chivasa *et al.*, 1997). Esta molécula puede inhibir la replicación viral, esto pudo ser observado en protoplastos de caupí infectados con “alfalfa mosaic virus” y en tejidos de tabaco infectados con TMV y PVX ; también se observó en pepino infectado con CMV que la aplicación de AS inhibía la entrada del virus en el floema (Murphy *et al.* 1999). Con respecto a patógenos de origen fúngico, aplicaciones exógenas de ácido salicílico, indujeron resistencia a *Alternaria solani* en tomate cultivado hidropónicamente (Spletzer y Enyedi, 1999).

Alamillo *et al.*, (2006), encontraron infecciones sistémicas de PPV en plantas de tabaco que expresan el gen *NahG*, que impide la acumulación de ácido salicílico en los tejidos al transformarlo en catecol, pero no en el silvestre, donde sólo pudo replicarse en hojas inoculadas, la replicación y acumulación de PPV, fue mayor en hojas localmente infectadas de plantas deficientes en AS

Huang *et al.* (2005), inocularon a plantas de *Arabidopsis thaliana* y tomate con CMV y “oilseed rape mosaic virus” y encontraron que un tercio de los genes inducidos han sido asociados previamente con la defensa de las plantas y respuestas de estrés. Según estos autores, en hospedantes susceptibles, los virus que infectan a las plantas inducen la expresión de un conjunto común de genes; en las interacciones virus-hospedante compatibles, la expresión de la mayoría de los genes está inducida por una vía dependiente de AS y puede compartir componentes de señales involucradas en interacciones incompatibles, pero su expresión incrementada no tendría efectos sobre la expresión viral.

EFFECTO DE LAS ALTAS TEMPERATURAS SOBRE LA ACUMULACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO Y LA RESPUESTA DE LA PLANTA FRENTE A PATÓGENOS

El aumento de predisposición de las plantas frente a enfermedades virales, consecuencia de la exposición de las mismas a altas temperaturas, podría explicarse en parte por cambios en la acumulación y síntesis de AS.

Plantas de tabaco portadoras del gen N, que confiere resistencia a TMV, responden a la inoculación con este virus exhibiendo hipersensibilidad, aumento en los niveles de AS e inducción de RSA. Yalpani *et al.* (1991), encontraron que plantas resistentes a TMV inoculadas con este patógeno y mantenidas a 32 °C, no desarrollaban lesiones locales en el folíolo inoculado, pero sí en las hojas superiores e inferiores una vez retornadas a 24 °C, lo que mostraba la infección sistémica del virus. Estos autores observaron que la acumulación de AS y la proteína relacionada con la patogénesis PR-1, inducida por TMV estaba inhibida totalmente a 32 °C.

Aplicando ácido salicílico en forma exógena a las hojas, se indujo la síntesis de PR-1 a 24 y 32 °C, pero no se restauró la capacidad de inducir reacción hipersensible en plantas mantenidas a 32 °C o en aquellas infectadas a 32 °C y luego mantenidas a 22 °C (Raskin, 1992; Malamy *et al.*, 1992). Dado que el AS no fue suficiente para desarrollar la respuesta hipersensible, se deduce que a altas temperaturas, muchas vías relacionadas con la defensa a patógenos se encuentran bloqueadas (Malamy *et al.*, 1992), por ej. a 32 °C, también se encuentra bloqueada la explosión de etileno asociada a AS.

Recientemente, Canto y Palukaitis (2002), aportaron más evidencias sobre el rol de este compuesto en el aumento de susceptibilidad a enfermedades causado por altas temperaturas, ya que encontraron que el gen N de tabaco que otorga resistencia a TMV por debajo de los 28°C, confiere también resistencia al virus mutantes TMV-GFP que expresa una proteína verde fluorescente. Esta resistencia es termo independiente y experimentos con plantas *nahG*, deficientes en AS demostraron que opera a través de una vía independiente del mismo. De esta manera se refuerza la idea de que existe una vinculación entre el AS y el aumento de susceptibilidad ocasionado por el estrés térmico.

EL USO DE INDUCTORES DE RESISTENCIA EN AGRICULTURA

El uso en agricultura de resistencia inducida mediada por inductores químicos, aplicados al cultivo en una especie de “preinmunización” ha sido discutida en los últimos años. Algunos ejemplos de estas moléculas son inductores de origen biótico como carbohidratos, ácido salicílico, ácidos grasos, jasmonatos aminoácidos, etileno, glucoproteínas, derivados de levaduras, metabolitos microbianos, así como inductores abióticos o semisintéticos; estos inductores tendrían la ventaja que podrían ser efectivos contra infecciones virales (Lyon y Newton, 1999). Si bien el ácido salicílico es un elemento esencial en la activación de RSA, existen otros inductores químicos como el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) o el ácido benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothioico S-methyl ester (ABM, BION[®]) y el ácido L- α -amino butyrico (ABA) que son independientes del AS (Sticher *et al.*, 1997; Kessmann *et al.*, 1994; Malamy *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 1996; Görlach *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2003; Bovié *et al.*, 2004; Guzzo,

2004; De Nardi *et al.*, 2006; Piris *et al.*, 2007). La aplicación de estas sustancias se incluye dentro de un paquete de prácticas culturales que contribuyen al manejo racional de plagas y enfermedades (Staub, 2001).

Existen antecedentes sobre el uso agrícola de activadores de resistencia como el acibenzolar metil (ABM), este compuesto fue seleccionado por poseer una molécula similar a la del AS e induce resistencia a un amplio rango de cultivos (Ruess, 1998). Aplicaciones semanales de este producto indujeron protección contra PVY en papa y tabaco, pero también tuvieron efecto sobre enfermedades de origen fúngico y bacteriano. Tally *et al.* (1999), redujeron la incidencia de plantas de tomate con síntomas de TSWV asperjadas con ABM. Romero *et al.* (2001), indujeron en pimiento, resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*, asperjando semanalmente con ABM. En tomate Louws *et al.* (2001), redujeron la severidad del ataque foliar de *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. En pimiento se observó una reducción del número de frutos en relación directa a la cantidad de ABM aplicada por hectárea (Tally *et al.*, 1999). En *Ananas comosus* la aplicación de acibenzolar methyl redujo la reproducción de *Rotylenchulus reniformis* y *Meloidogyne* (Chinnasri *et al.*, 2006) e indujo la síntesis de PR -1 en raíces de las plantas tratadas.

El uso de inductores de resistencia podría tener mayor utilidad en cultivos bajo cubierta donde mayor cantidad de variables ambientales están bajo control y podrían combinarse con el uso de biocontroladores (Lyon y Newton, 2000). Existen ejemplos de iniciativas de organismos estatales que promueven el estudio de este tipo de compuestos. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) ha desarrollado un proyecto para investigar RSA en el cultivo de papa para inducir la resistencia a tizón tardío, áfidos, nemátodos y PVY (USDA, 2003). En el estado de Pennsylvania en el mismo país, también ha abordado el uso de elicitors en el manejo de plagas y enfermedades en cultivos bajo cubierta (Hoover, 2004).

Cómo hemos expuesto en la introducción del capítulo 1 y 2 de esta tesis, se han detectado quiebres de la resistencia genética a TSWV en distintos países productores de hortalizas, en el caso del pimiento estos problemas son más acentuados, obligando al

productor a controlar el vector, de la misma manera que lo hace cuando cultiva un material susceptible (Picó, 2002; Roggero *et al.*, 2002; Margaria, 2004), este fenómeno se ha observado también en nuestro país (Calvo *et al.*, 2008). Por otra parte Moury *et al.*, (1998), observaron que la resistencia a TSWV conferida por el gen Tsw en pimiento es menos estable a 32 °C que a 22 °C. Soler *et al.*, (1998), encontraron una interacción significativa entre la edad del hospedante y el régimen de temperatura, con una mayor susceptibilidad a regímenes de 30/18 °C (día/noche) que 25/18 °C, en poblaciones de *Capsicum chinense*, resistentes a TSWV. Estos antecedentes nos permiten especular sobre el posible uso que podrían tener los compuestos como el ABM si se hallaran momentos óptimos en que pudieran aplicarse, para mejorar la expresión de genes de resistencia con dificultades para manifestar su efecto a altas temperaturas. El efecto de la aplicación de estos inductores sobre parámetros productivos debería tenerse en cuenta ya que en algunos casos se han detectado efectos no deseables en el rendimiento de los cultivos en que se aplicaron (Tally *et al.*, 1999).

Según los resultados expuestos en el capítulo 2 de esta tesis, la exposición de plantas jóvenes de tomate a las altas temperaturas previamente a la inoculación con TSWV, favorece la infección viral y el establecimiento del patógeno en los tejidos inoculados, esto se traduce en una mayor severidad de síntomas sistémicos si el hospedante es susceptible y un atraso en la expresión del gen de resistencia manifestado a través de un mayor número y tamaño de lesiones locales cuando el hospedante es portador del gen de resistencia Sw5. Existen numerosos ejemplos sobre el efecto del ácido salicílico en la respuesta del hospedante a enfermedades de origen viral, aunque su misión aparentemente, no sea ser el primer mensajero en el proceso. Entre los cambios sufridos por el hospedante, las dificultades en acumular ácido salicílico que presenta la célula expuesta a altas temperaturas, la privaría de un componente esencial en el normal inicio de los mecanismos de defensa frente al ataque de un patógeno.

En el presente capítulo se estudió el efecto de la aplicación de ácido salicílico a plantas jóvenes de tomate susceptibles y resistentes a TSWV para conocer en qué medida se alteraba su respuesta frente a la infección en condiciones controladas y bajo condiciones de estrés térmico. También se estudió el efecto de la aplicación de AS sobre el crecimiento y parámetros productivos en condiciones controladas y bajo presión de inóculo natural.

HIPÓTESIS

El ácido salicílico está involucrado en el aumento de susceptibilidad a TSWV ocasionado por el estrés térmico. Genotipos deficientes en la producción de AS serán particularmente susceptibles a la infección viral.

La aplicación exógena de ácido salicílico puede contribuir a reducir la incidencia de TSWV en cultivos comerciales de tomate sin provocar alteraciones en el crecimiento ni en parámetros productivos.

OBJETIVOS

Determinar los efectos de aplicaciones exógenas de ácido salicílico sobre el progreso de la infección y la severidad de síntomas producidos por TSWV, en plantas de cultivares de tomate resistentes y susceptibles y en genotipos deficientes en la producción de AS, pretratadas con estrés térmico.

Describir los efectos de aplicaciones exógenas de ácido salicílico en cultivos de tomate sometidos a presión de inóculo natural.

Determinar el efecto de aplicaciones exógenas de ácido salicílico sobre el crecimiento y la parámetros productivos de cultivos comerciales de tomate resistentes y susceptibles a la infección por TSWV

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES GENÉTICOS UTILIZADOS

Para las experiencias, se utilizaron dos materiales genéticos comerciales de tomate, ya probados en diferentes épocas de cultivo y condiciones de manejo: Gol, heterocigota para el gen Sw5 que confiere resistencia a tospovirus y Bonanza, susceptible, ambos con similar estructura de planta y tipo de fruto (hábito de crecimiento indeterminado, fruto redondo de forma estructural) (Mitidieri *et al.*, 1996, 2001). También se utilizó un genotipo mutante portador del gen NahG que transforma el ácido salicílico en catecol (Silvestre = Money maker), cedido por el Dr. Matthew Smoker, Sainsbury Laboratory, Cambridge University, Inglaterra.

PROCEDIMIENTOS COMUNES A TODOS LOS EXPERIMENTOS

Obtención de plantines, preparación del inóculo y aplicación de los tratamientos de estrés (Ver capítulo 2)

TRATAMIENTOS CON ÁCIDO SALICÍLICO

Una vez finalizados los tratamientos de estrés y estabilizada la temperatura foliar, se asperjó las plantas con una solución de ácido salicílico 1mM + 1µl de Tween 20.

VARIABLES DE RESPUESTA

Evaluación de la enfermedad, progreso de la enfermedad y evaluación de parámetros productivos (Ver capítulo 2).

Pruebas de diagnóstico

Para confirmar la presencia de tospovirus en las plantas cultivadas bajo presión de inóculo natural, se extrajeron muestras de ápices de todas las plantas, éstas fueron sometidas al test de ELISA, para los mismos se utilizaron reactivos de AGDIA, incluyendo un anticuerpo contra TSWV y otros combinado que reconoce GRSV y TCSV.

EVALUACIONES A CAMPO BAJO CONDICIONES DE INÓCULO NATURAL

Las experiencias se realizaron en la EEA INTA San Pedro, Lat SUD 33° 41', Longitud W. G. 59° 41'. Plantas jóvenes de tomate se transplantaron, en un invernadero metálico tipo túnel (8 x 50), sin ventana cenital y sin malla anti-insectos en las aberturas, el marco de plantación fue de surcos dobles a 50 cm entre surcos, 1 metro de calle entre ellos y una distancia entre plantas de 0.4 m (Figura 3.1). Se realizaron aplicaciones preventivas para el control de trips, las plantas se mantuvieron hasta el final de la cosecha, para obtener datos relativos a la producción. La preparación del suelo, se realizó a base de arado de reja y cincel, se agregó cama de pollo, como enmienda orgánica, a razón de 4 kg/m², que fue incorporado con sucesivas pasadas de rotocultivador. Durante el cultivo se suministró semanalmente, fertilizantes solubles a través del riego por goteo, a base de nitrato de calcio, nitrato de potasio, triple 15 y sulfato de magnesio. Las plantas fueron asperjadas semanalmente con una solución de ácido salicílico 1mM, hasta los 45 días después del transplante. Los experimentos se realizaron los años 1999, 2000, 2004 y 2005, se utilizaron los híbridos Bonanza (susceptible) y Gol (resistente). Los controles fueron asperjados con agua destilada con el pH corregido al mismo valor que la solución de ácido salicílico. En la Tabla 3.1 se muestran las precipitaciones y temperatura promedio diarias 60 días antes y después del transplante, registradas en la Estación Meteorológica de la EEA INTA San Pedro (Uviedo R., 1999, 2000, 2004 y 2005). No se obtuvieron diferencias significativas para el número de folíolos con daño de trips por planta, a los 30 días del transplante, en los recuentos realizados en las campañas 2000 y 2005, los promedios fueron 0.79 y 14.76 respectivamente.

Tabla 3.1 Precipitaciones acumuladas (mm) y promedio de las temperaturas (°C) medias en abrigo, 60 días antes y después de cada transplante de las evaluaciones a campo bajo condiciones de inóculo natural.

| | 1999 | 2000 | 2004 | 2005 |
|----------------------|-----------------|---------------|---------|----------|
| Fecha transplante | 14 de diciembre | 22 septiembre | 5 Enero | 20 Enero |
| Precipitaciones (mm) | | | | |
| Antes | 147.8 | 147.4 | 261.5 | 206.0 |
| Después | 198.7 | 256.5 | 268.6 | 184.6 |
| T media °C | | | | |
| Antes | 20.5 | 11.7 | 21.0 | 23.7 |
| Después | 24.4 | 17.1 | 23.2 | 22.0 |

En la campaña 2004 se realizó un estudio del ataque de nematodos y podredumbres radiculares. Una vez finalizada la cosecha se arrancaron las plantas y se analizaron las raíces individualmente, se hizo un recuento de agallas y se dividió la masa radicular sana de la que tenía síntomas de podredumbres. Se pesó cada porción sana o enferma para estimar el porcentaje de raíz afectado.

EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE ORGANISMOS DEL FILOPLANO, PATÓGENOS FOLIARES Y RADICULARES

Veinte discos de hoja de 10 mm de diámetro fueron extraídos de cada parcela y desinfectados sumergiéndolos durante 10 segundos en alcohol etílico al 70 % e hipoclorito de sodio al 20 % durante dos minutos, posteriormente fueron enjuagados pasándolos por agua destilada estéril dos veces, secados en papel de filtro y sembrados en cajas de Petri de 9 cm de diámetro (5 por caja), conteniendo media agar papa glucosado al 2%. Luego de incubarse una semana a 25 °C en estufa de cultivo se hizo el recuento de colonias presentes. De la misma manera se procedió para realizar los aislamientos de patógenos presentes en las raíces, el material inicial fueron trozos de raíces mostrando sectores necrosados o con podredumbres. Para la evaluación del daño ocasionado por patógenos foliares se utilizó una escala subjetiva en base al porcentaje de tejido foliar afectado, donde 0= sano, 1= 10 al 25 % de tejido afectado, 2= 25 al 50 % de tejido afectado, 3= 50 al 75 % de tejido afectado, 4= 75 al 100 % de tejido afectado y 5= 100 % de tejido afectado.

Una vez finalizada la cosecha, se extrajeron todas las raíces, se lavaron, se contaron las agallas presentes y se evaluó el porcentaje de raíces necrosadas, de las cuales se extrajeron trozos para realizar aislamientos con un procedimiento similar al utilizado con los discos de hoja.

DISEÑO ESTADÍSTICO Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Para los tratamientos en condiciones controladas, cada experimento se repitió 3 veces, con 10 plantas por tratamiento y por repetición. Una vez aplicados los tratamientos las plantas se distribuyeron en un diseño completamente aleatorizado. Para las evaluaciones

bajo presión de inóculo natural se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizados, con 8 repeticiones y 10 plantas por parcela.

Luego de verificar la normalidad de las variables, se realizó el análisis de la variancia, mediante el procedimiento GLM, del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1993). Las diferencias entre medias fueron analizadas mediante el test de rangos múltiples de Duncan.

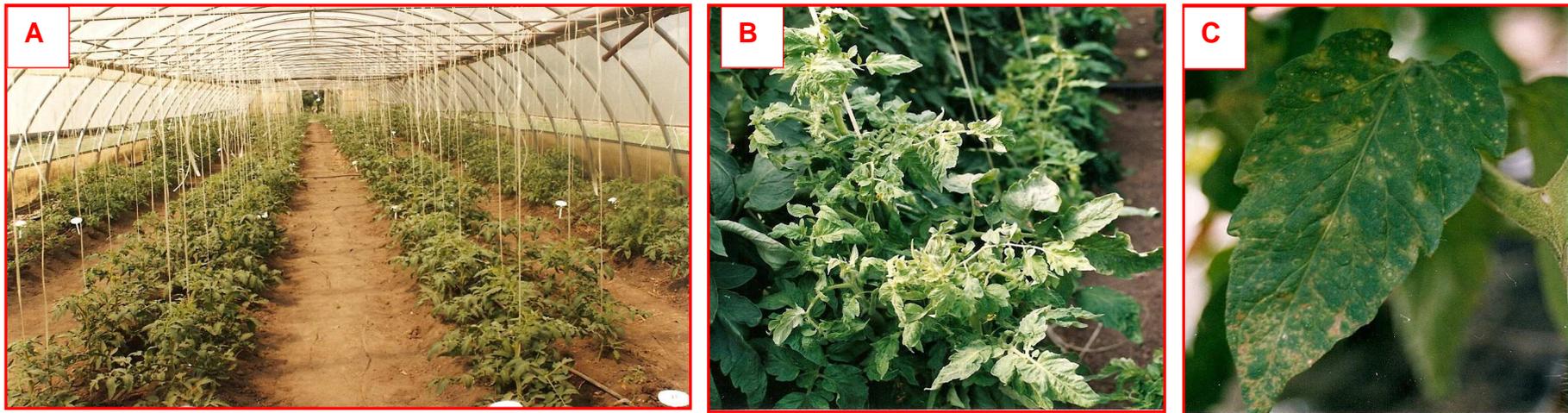


Figura 3.1 Evaluación del efecto de aplicaciones de ácido salicílico bajo presión de inóculo natural.

A Para evaluar rendimiento las plantas fueron transplantadas en invernadero comercial bajo presión de inóculo natural.

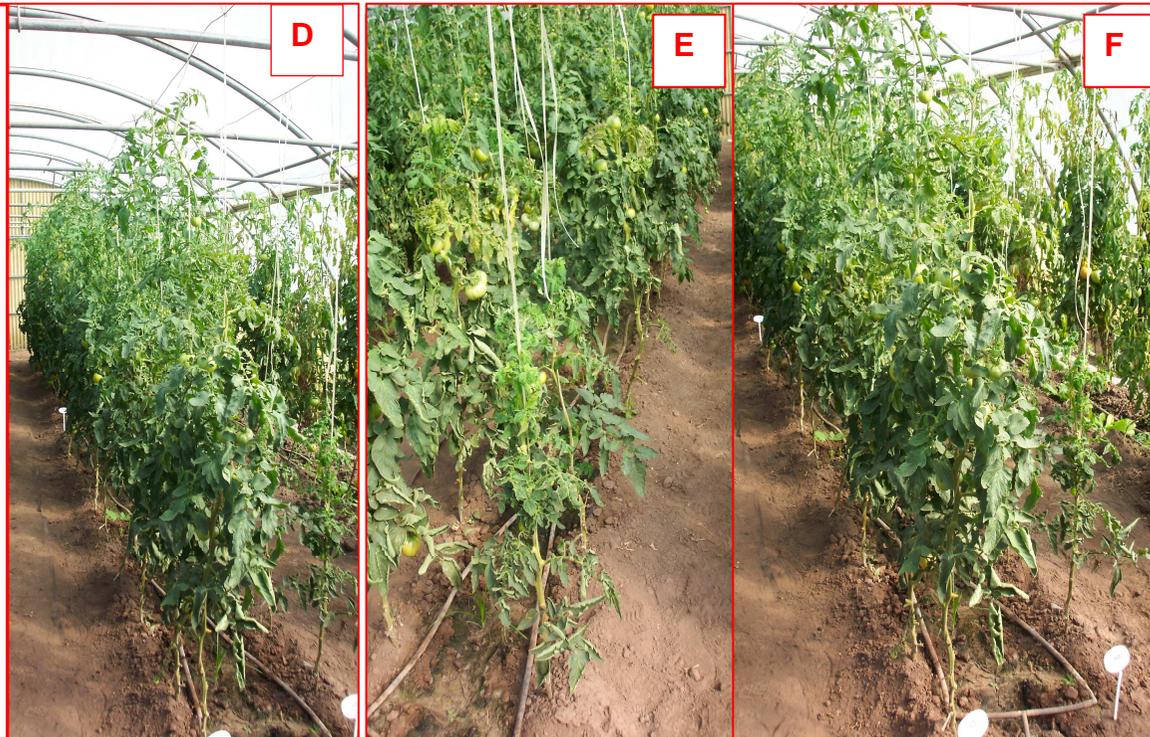
B Síntomas sistémicos de “peste negra” en el híbrido susceptible Bonanza causados por una infección natural.

C Síntomas de TSWV en hojas.

D. Se aplicó ácido salicílico (AS) 1 mM una vez por semana durante los primeros 45 días después del transplante. Las plantas tratadas (izquierda) y sin tratar (derecha) fueron transplantadas en surcos dobles con un diseño en bloques completos al azar.

E. Plantas sin tratamientos de ácido salicílico.

F. Plantas tratadas con ácido salicílico.



RESULTADOS

MODIFICACION DE LA PREDISPOSICION FRENTE A TSWV POR APLICACIONES EXOGENAS DE ACIDO SALICILICO. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y PARAMETROS PRODUCTIVOS

A) Híbrido susceptible Bonanza

En la figura 3.2 y 3.3 se observan los resultados de la aplicación de ácido salicílico sobre la manifestación de síntomas de TSWV y parámetros productivos respectivamente.

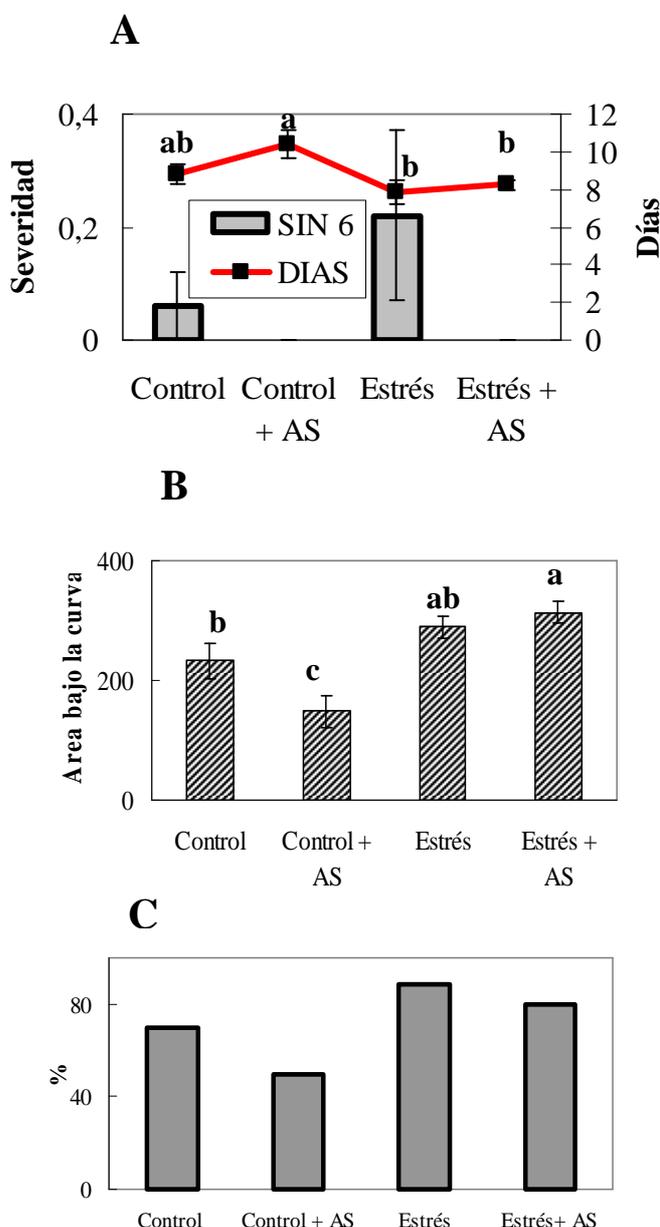


Figura 3.2 Efecto del estrés térmico y la aplicación de ácido salicílico antes de la inoculación.

A Severidad de síntomas sistémicos a los 6 días de la inoculación (SIN 6) y días hasta aparición de síntomas.

B Área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

C Porcentaje de folíolos apicales ELISA + a los 15 días de la inoculación. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Se muestran medias de una repetición.

Plantas inoculadas una hora después de finalizado el estrés, con una cepa de TSWV. Estrés = Plantas sometidas a 40 °C durante 24 hs. Control = Plantas sometidas a 25 °C. AS = aplicación de ácido salicílico 1 mM antes de la inoculación., Área bajo la curva = se calculó según una ecuación que utiliza los valores de severidad tomados durante los 15 días posteriores a la inoculación. Medias con letras iguales no difieren entre sí al 5 % para el test de medias múltiples de Duncan.

En plantas no estresadas la aplicación exógena de ácido salicílico previo a la inoculación contribuyó a atenuar los síntomas sistémicos y redujo el número de folíolos apicales ELISA + a los 15 días de la inoculación (Figs. 3.2 y Ver Anexo Tablas 3.1 y 3.2).

En las plantas inoculadas se observó mayor rendimiento en las plantas control tratadas con AS y menor descarte por virósico en las plantas control y sometidas a estrés (Figura 3.3, Ver Anexo Tablas 3.3.1 y 3.3.2). Los tratamientos no modificaron la proporción de frutos comerciales grandes, medianos y pequeños (Fig. 3.3, Ver Anexo Tablas 3.4.1 y 3.4.2).

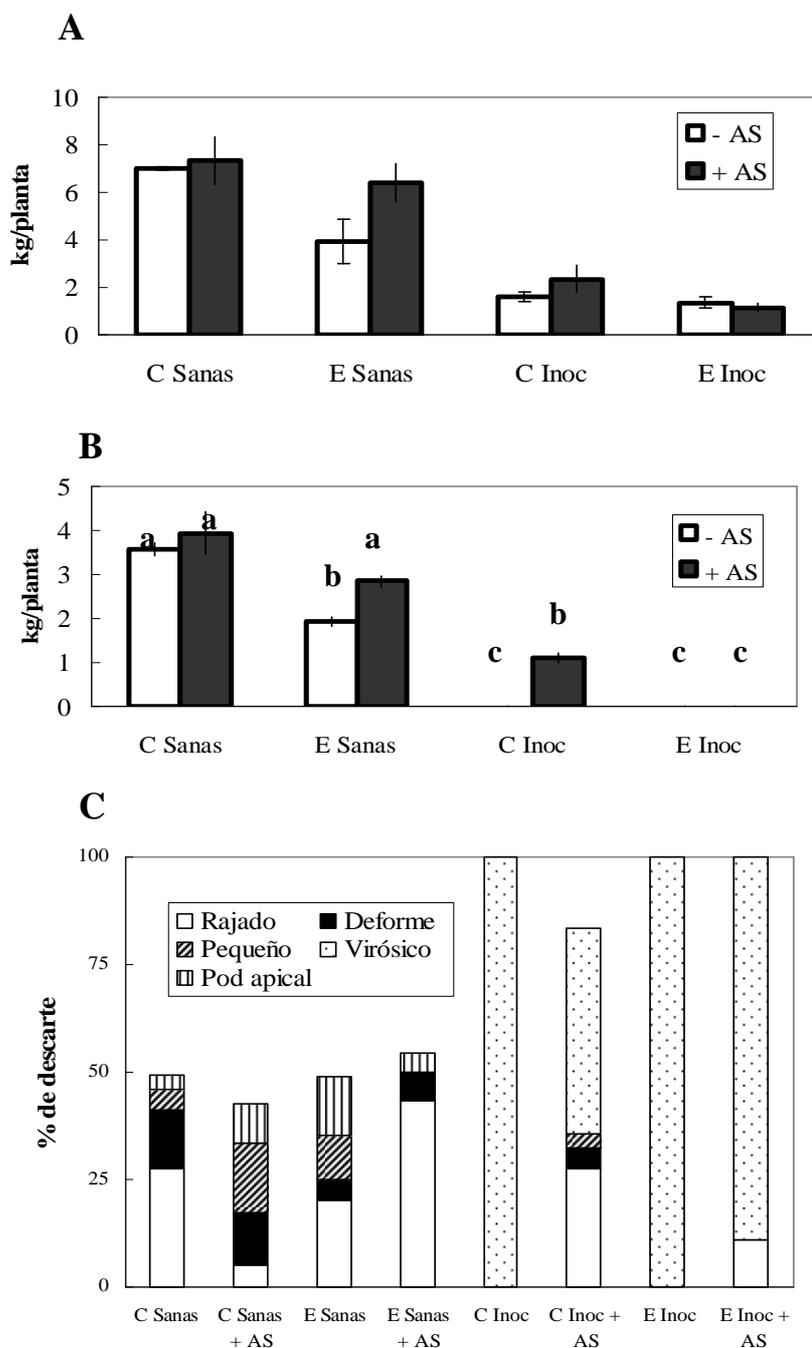


Figura 3.3. Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. **A** Rendimiento total (kg/planta) **B** Rendimiento comercial (kg/planta) **C** Causas de descarte para plantas sanas e inoculadas (Inoc). Híbrido. Bonanza susceptible a TSWV. Se muestran medias de una repetición E= Tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C) antes de la inoculación, AS= aplicación de ácido salicílico 1 mM antes de la inoculación. Medias con letras iguales no difieren entre sí al 5 % para el test de medias múltiples de Duncan.

B) Híbrido resistente Gol

En las figuras 3.4 y 3.5 se muestran los resultados de la aplicación de ácido salicílico sobre el desarrollo de lesiones locales y la concentración viral en las plantas inoculadas con TSWV.

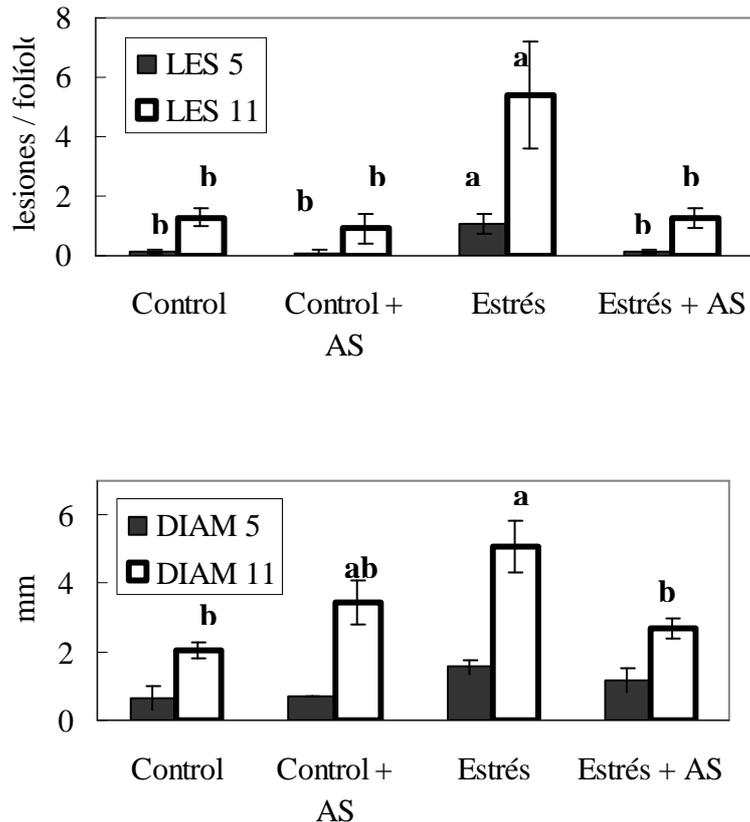


Figura 3.4 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Lesiones locales en el folíolo inoculado y diámetro de las mismas (mm) a los 5 y 11 días de la inoculación. Se muestran medias de una repetición. Estrés= 24 hs a 40 °C previo a la inoculación; AS = aplicación de ácido salicílico (1 mM), previo a la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV.

La aplicación de ácido salicílico antes de la inoculación, redujo el número de lesiones locales en las plantas sometidas a estrés térmico (Fig 3.4)(Ver Anexo Tablas 3.5.1 y 3.5.2). El diámetro de las lesiones fue mayor en las plantas sometidas a estrés térmico antes de la inoculación (Fig 3.4), la aplicación de ácido salicílico redujo el tamaño de estas lesiones (Ver Anexo Tablas 3.5.1 y 3.5.2).

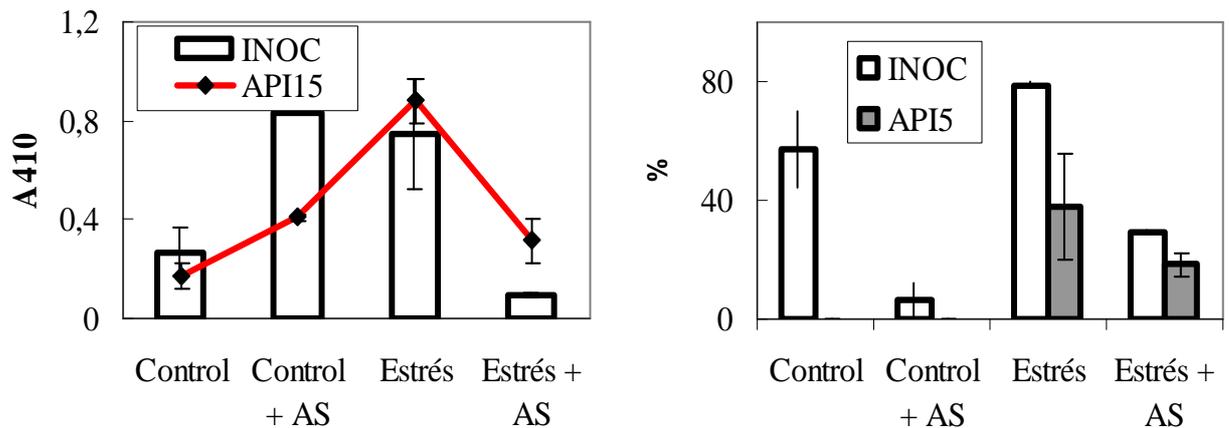


Figura 3.5 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. **Izquierda** Test de ELISA (Absorción a 410 nm) para folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación (INOC) y folíolo apical a los 15 (API15) días de la inoculación. **Derecha** Porcentaje de folíolos ELISA positivos inoculados (INOC) y apicales a los 5 días de la inoculación (API 5). Se muestran medias de una repetición. Híbrido Gol resistente a TSWV.

Estrés = plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C). AS= aplicación de ácido salicílico 1 mM antes de la inoculación.

El estrés térmico, incrementó la concentración viral en los folíolos inoculados a los 5 días después de la inoculación y en el folíolo apical a los 15 días de la inoculación, el ácido salicílico revirtió este efecto en el folíolo apical (Fig 3.5, Ver Anexo Tabla 3.6). El estrés térmico, incrementó el número de folíolos inoculados y apicales positivos, 5 días después de la inoculación ($P < 5\%$), el ácido salicílico revirtió este efecto en el folíolo inoculado ($P < 1\%$).

En la figura 3.6 se observan los efectos de la aplicación de ácido salicílico sobre parámetros productivos en plantas inoculadas con TSWV en condiciones controladas.

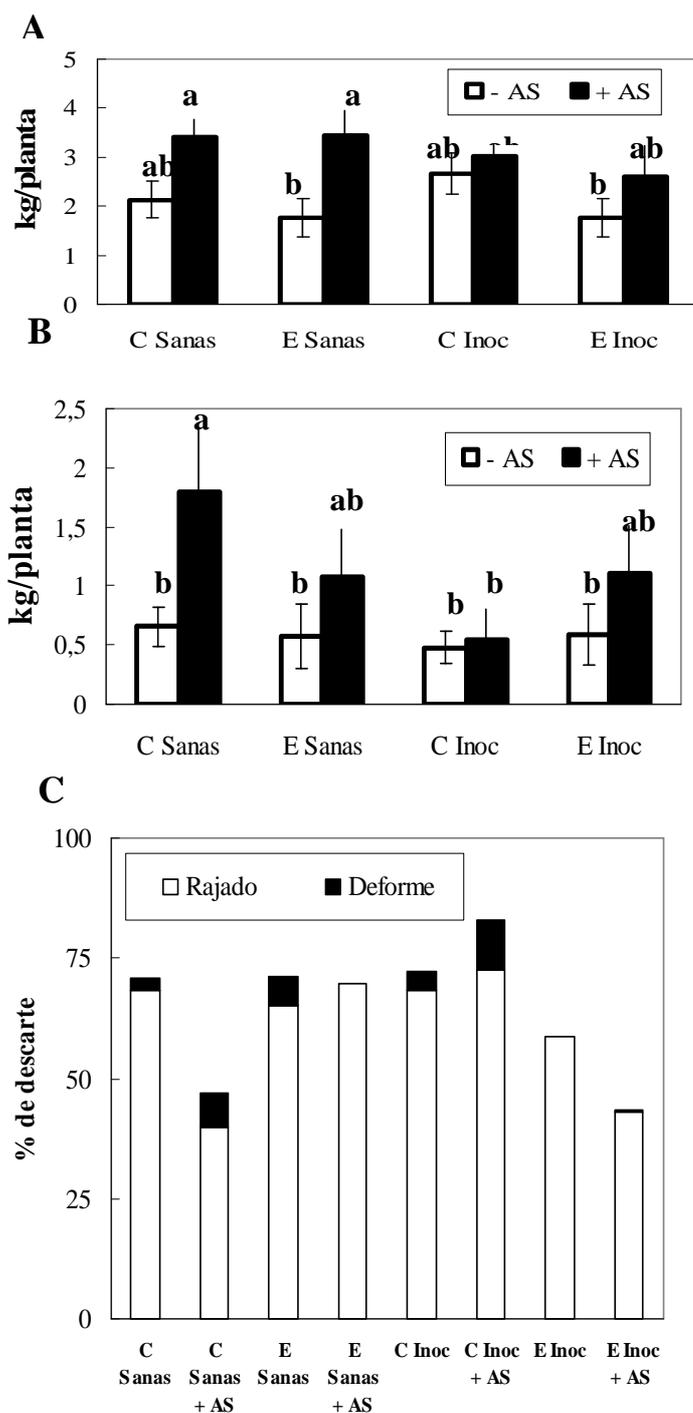


Figura 3.6 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. **A** Rendimiento total (kg/planta) **B** Rendimiento comercial (kg/planta) **C** Causas de descarte para plantas sanas e inoculadas (Inoc). Se muestran medias de una repetición. Híbrido Gol resistente a TSWV. E= Tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C) antes de la inoculación. AS= aplicación de ácido salicílico 1 mM antes de la inoculación.

La aplicación de ácido salicílico generó aumentos de rendimiento total en las plantas inoculadas y sanas a pesar de que no se observaron plantas con síntomas sistémicos (Fig. 3.6, Ver Anexo Tablas 3.7.1, 3.7.2, 3.8.1 y 3.8.2), tampoco se observaron cambios en las causas de descarte (Fig. 3.6).

RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO Y APLICACIONES CON ACIDO SALICILICO EN UN GENOTIPO DEFICIENTE EN PRODUCCION DE ACIDO SALICILICO

Este experimento se realizó para conocer cómo responde un material mutante NahG deficiente en ácido salicílico, comparado con su silvestre Moneymaker y de esa manera poder inferir la intervención de este compuesto en los cambios de predisposición frente a TSWV ocasionados por el estrés térmico. En la figura 3.7 se muestra el efecto de la aplicación de AS sobre la expresión de síntomas de TSWV en plantas del mutante y el silvestre inoculadas a distintos tiempos luego de finalizado el estrés térmico. En las figuras 3.8 y 3.9 se observan los resultados de la aplicación de AS sobre el porcentaje de folíolos inoculados y apicales ELISA positivos.

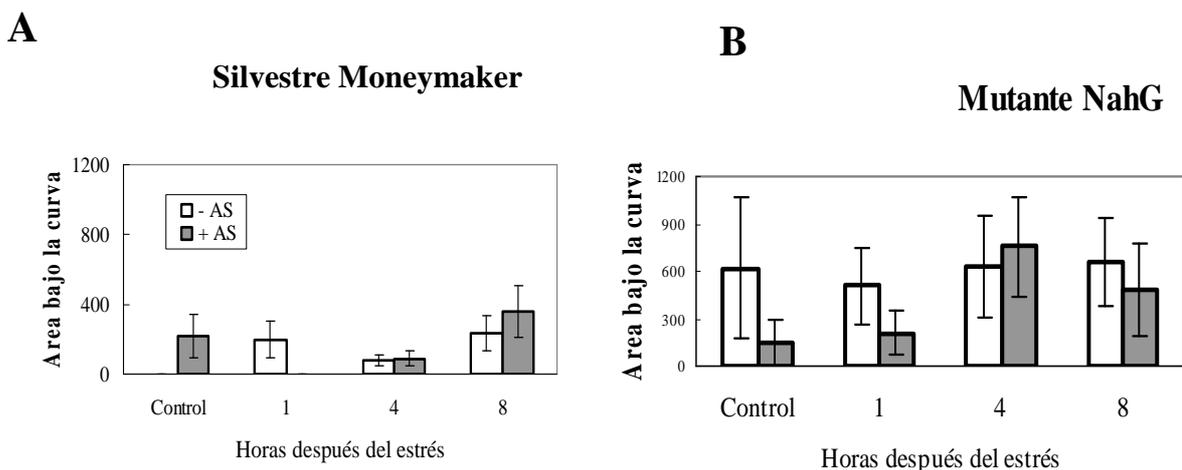


Figura 3.7 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) y efecto del ácido salicílico. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad. **A** Silvestre Money maker. **B** Mutante portador del gen NahG que transforma el ácido salicílico en catecol.

Plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). Area bajo la curva de progreso de la enfermedad = se calculó según una ecuación que utiliza los valores de severidad tomados durante los 15 días posteriores a la inoculación.

A los 16 días de la inoculación se observó en el material silvestre, mayores valores de área bajo la curva de progreso de la enfermedad debido a la aplicación de estrés térmico ($P < 5\%$), en plantas donde no se aplicó ácido salicílico (Fig 3.7, Ver Anexo Tabla 3.16).

El mutante *NahG* no manifestó estas diferencias de susceptibilidad relacionadas a la temperatura previa a la inoculación, pero la aplicación de ácido salicílico atenuó síntomas en las plantas control y una hora después del estrés. Con respecto al silvestre, el mutante manifestó mayores valores de área bajo la curva de progreso de la enfermedad (Fig 3.7) (Ver Anexo Tablas 3.16 y 3.17).

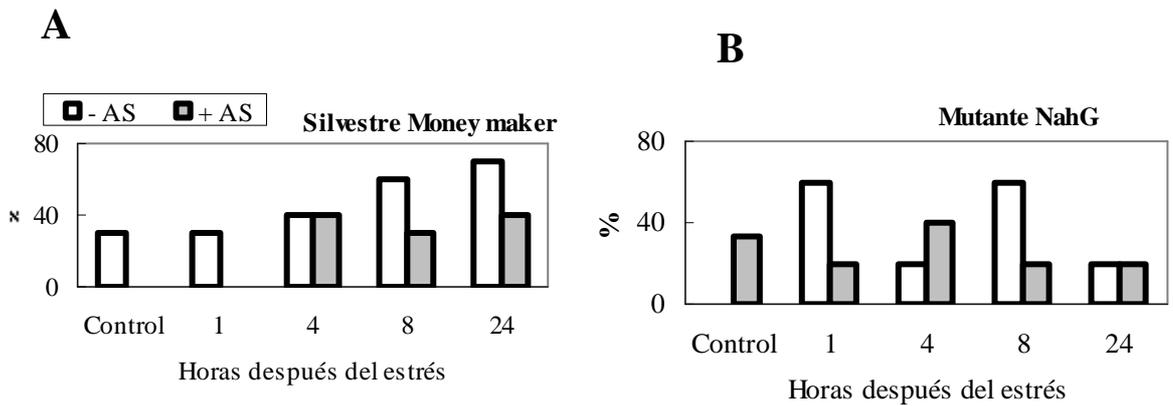


Figura. 3.8 Folíolos inoculados ELISA positivos 5 días después de la inoculación. **A** Silvestre Money maker. **B** Mutante *NahG* deficiente en ácido salicílico. Plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). AS= Tratamiento con ácido salicílico (1 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés.

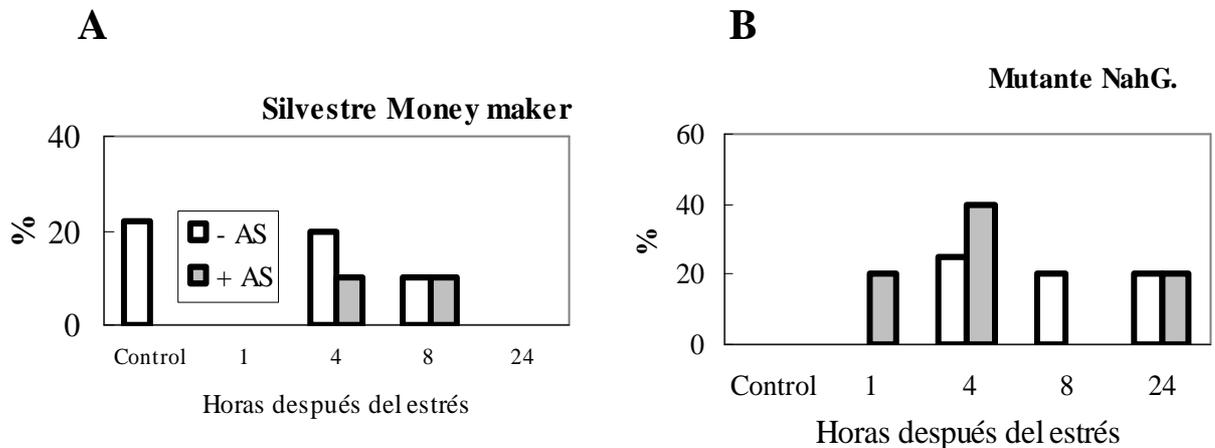


Figura. 3.9 Folíolos apicales ELISA positivos 5 días después de la inoculación. **A** Silvestre Money maker. **B** Mutante *NahG* deficiente en ácido salicílico. Plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). AS= Tratamiento con ácido salicílico (1 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés.

El silvestre Moneymaker se comportó de manera similar al híbrido susceptible Bonanza en cuanto a que el ácido salicílico redujo el porcentaje de folíolos inoculados y apicales ELISA positivos 5 días después de la inoculación. Esta respuesta fue aleatoria en el mutante *NahG* que degrada el ácido salicílico en catecol (Fig 3.8 y 3.9).

EFECTO DE APLICACIONES DE ÁCIDO SALICÍLICO SOBRE SOBRE EL CRECIMIENTO, PARAMETROS PRODUCTIVOS Y LA MANIFESTACION DE SINTOMAS DE TSWV BAJO CONDICIONES DE INÓCULO NATURAL

A) EN PLANTAS NO SOMETIDAS A ESTRÉS TÉRMICO ANTES DEL TRANSPLANTE

En la figura 3.10 se observa el número de plantas con síntomas sistémicos de tospovirus en las distintas campañas ensayadas, en las figuras 3.11 y 3.12 se muestra el resultado de estas aplicaciones sobre el rendimiento total y comercial y el descarte por virósico.

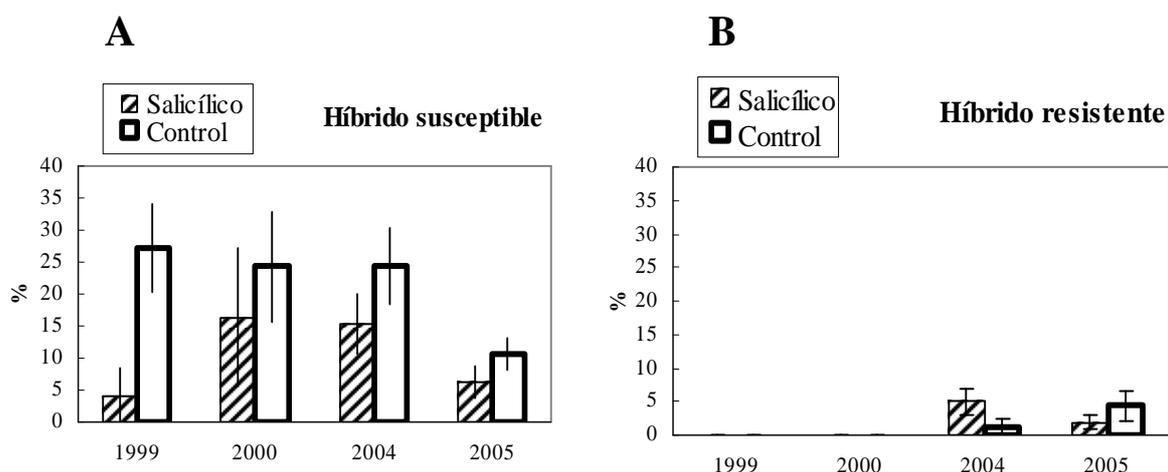


Figura 3.10 Efecto de aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Plantas con síntomas de "peste negra" al final del ciclo de cultivo bajo condiciones de inóculo natural, campañas 1999, 2000, 2004 y 2005. **A** Híbrido susceptible y **B** resistente a TSWV. Salicílico=Plantas asperjadas semanalmente con una solución de ácido salicílico (1 mM) los primeros 45 días después del transplante. Control = Plantas asperjadas semanalmente con agua destilada pH = 3 los primeros 45 días después del transplante.

En condiciones de inóculo natural, los tratamientos con ácido salicílico redujeron el porcentaje de plantas con síntomas de peste negra en el híbrido susceptible (Fig 3.10). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para la interacción híbrido * ácido salicílico para las campañas 1999 y 2004 ($P < 1$ y 5 % respectivamente) (Tablas 3.9.1 y 3.9.2). En el híbrido resistente no se observó un efecto definido, pero sí es importante el aumento de plantas con síntomas sistémicos registrado en las sucesivas campañas. En las

campañas 2004 y 2005, no se obtuvieron diferencias significativas entre el híbrido resistente y el susceptible para plantas ELISA + frente a TSWV a los 60 días del transplante, pero sí para TCSV/GRSV, con menores porcentajes para el híbrido resistente, esto puede deberse a que las cepas del patógeno que vencen el gen de resistencia sean mutaciones de TSWV.

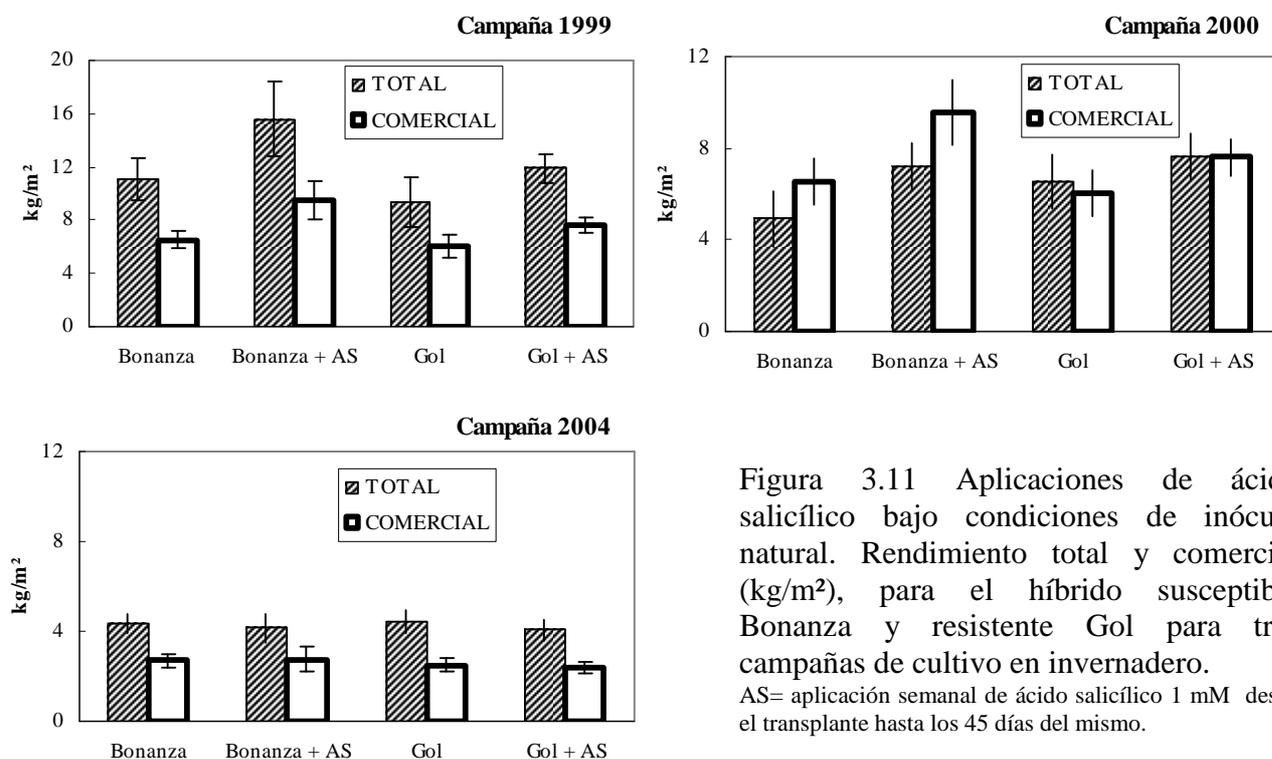


Figura 3.11 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Rendimiento total y comercial (kg/m²), para el híbrido susceptible Bonanza y resistente Gol para tres campañas de cultivo en invernadero. AS= aplicación semanal de ácido salicílico 1 mM desde el transplante hasta los 45 días del mismo.

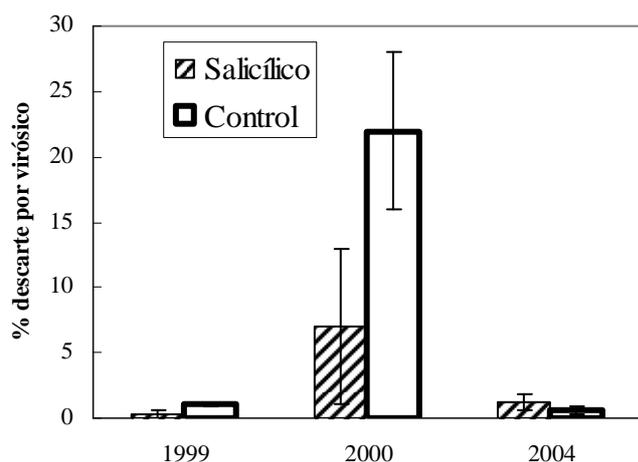


Figura 3.12 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Descarte por virósico para tres campañas de cultivo en invernadero. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Salicílico=Plantas asperjadas semanalmente con una solución de ácido salicílico (1 mM) los primeros 45 días después del transplante. Control = Plantas asperjadas semanalmente con agua destilada pH = 3 los primeros 45 días después del transplante.

Las plantas que recibieron el tratamiento de ácido salicílico mostraron mayor rendimiento total y comercial en las campañas 1999 y 2000, tanto en el híbrido susceptible

como en el resistente (Fig 3.11). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para rendimiento comercial ($P < 5\%$) para el híbrido Bonanza (Ver Anexo Tablas 3.10, 3.11, 3.12 y 3.13). El descarte por virósico fue menor ($P < 5\%$) en la campaña 2000 para las plantas asperjadas con ácido salicílico en este híbrido (Fig 3.12)(Ver Anexo Tabla 3.10). El resto de las causas de descarte no mostró diferencias significativas para ninguno de los híbridos. En las campañas 1999 y 2000 se evaluó el daño causado por *Phytophthora infestans* y *Leveillula taurica* en todas las parcelas, no se obtuvieron diferencias entre plantas tratadas o no con ácido salicílico (Ver Anexo Tabla 3.9.3). En la tabla 3.2 se observan los resultados de los recuentos de agallas y porcentaje de podredumbres radiculares encontrados en ambos híbridos.

Tabla 3.2 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Número de agallas/g raíz, porcentaje de raíces con síntomas de podredumbres radiculares y materia seca raíz.

| HIBRIDO | AS | AGALLAS | PODREDUMBRES RADICULARES | MATERIA SECA RAIZ |
|----------------|-----------|----------------|-------------------------------------|------------------------------|
| GOL | NO | 10.71 ± 1.56 | 37.50 ± 4.59 | 7.40 ± 0.48 |
| GOL | SI | 10.19 ± 1.21 | 48.95 ± 4.58 | 7.06 ± 0.41 |
| BONANZA | NO | 9.24 ± 1.30 | 37.42 ± 4.59 | 6.45 ± 0.33 |
| BONANZA | SI | 8.70 ± 1.69 | 31.97 ± 4.17 | 7.68 ± 0.42 |

AS= aplicación semanal de ácido salicílico (1 mM) hasta 45 días del transplante.

No se observaron diferencias en el número de agallas ocasionadas por nematodos, ni en el peso seco de las raíces. La interacción Híbrido * ácido salicílico fue estadísticamente significativa ($P < 5\%$), el híbrido Gol mostró mayores porcentajes de raíces con podredumbres radiculares en las plantas asperjadas con ácido salicílico, en el híbrido Bonanza el efecto es inverso (Tabla 3.2). Los principales patógenos aislados fueron *Fusarium solani* y *Pyrenochaeta lycopersici*.

B) EN PLANTAS SOMETIDAS A ESTRÉS TÉRMICO ANTES DEL TRANSPLANTE

En la figura 3.13 se observa el número de plantas con síntomas sistémicos de “peste negra”, el rendimiento total y comercial en plantas estresadas antes del transplante y que posteriormente fueron asperjadas con AS.

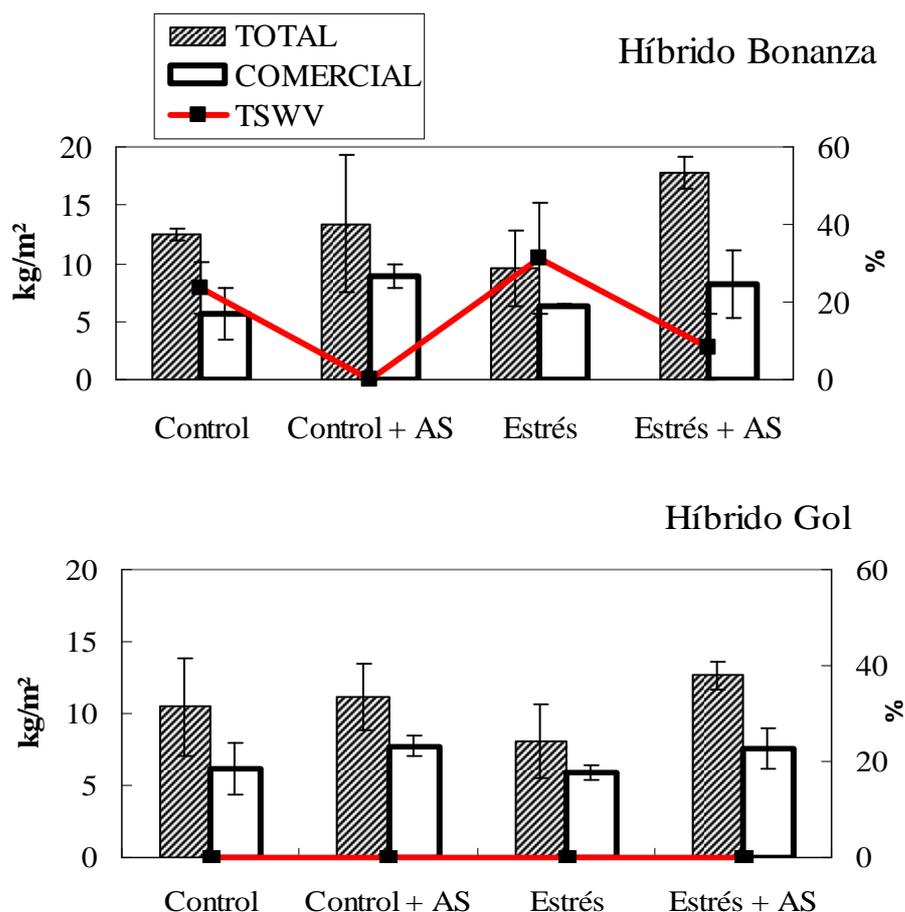


Figura 3.13 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural en plantas sometidas al estrés térmico antes del transplante. Rendimiento total y comercial (kg/m²), para el híbrido susceptible Bonanza y resistente Gol en invernadero y porcentaje de plantas con síntomas de TSWV. Estrés= plantas sometidas a estrés térmico (24 hs a 40 °C) antes del transplante. AS= aplicación semanal de ácido salicílico 1 mM hasta 45 días después del transplante.

Las plantas asperjadas con ácido salicílico y que recibieron el efecto del estrés térmico antes del transplante mostraron mayores rendimientos totales y comerciales tanto en el híbrido susceptible como en el resistente (Fig 3.13). En el híbrido susceptible la aplicación de ácido salicílico redujo el número de plantas con síntomas de TSWV (Fig 3.13). No se obtuvieron diferencias para parámetros de crecimiento como la altura a los 30, 60 y 90 días del transplante ni para el número de colonias de *Epicoccum* ni *Alternaria alternata* en discos de hojas sembrados en medio de cultivo.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este capítulo coinciden en términos generales con los antecedentes citados por otros autores en que se describe un importante rol del ácido salicílico en promover la respuesta de resistencia del hospedante frente a patógenos de tipo viral, (Malamy *et al.*, 1990; Gaffney *et al.*, 1993; Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*; 1997, Thulke y Conrath, 1998; Jeun *et al.*, 2000; Galis *et al.*, 2004; Silverman *et al.*, 2005), fúngico (Metraux, 1990; Hammond-Kosack *et al.*, 1996; Spletzer y Enyedi, 1999) o bacteriano (Rasmussen *et al.* 1991).

EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE AS SOBRE LA EXPRESION DE SINTOMAS DE TSWV EN UNA INTERACCION PLANTA PATOGENO COMPATIBLE

Se observó en el híbrido susceptible Bonanza, que en plantas no estresadas la aplicación exógena de ácido salicílico previo a la inoculación contribuyó a atenuar los síntomas sistémicos y redujo el número de folíolos apicales ELISA + a los 15 días de la inoculación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por White *et al.*, (1983) y Chivasa *et al.*, (1997) en tabaco susceptible a TMV, quienes observaron luego de aplicar AS, reducción de la cantidad de virus en el tejido infectado y retraso en la aparición de síntomas; con los de Galis *et al.*, (2004) quienes en plantas de *Phaseolus vulgaris* regadas con AS 1 mM, observaron la inhibición parcial de la acumulación de “white clover mosaic virus” en las hojas infectadas y en parte con los de Murphy y Carr (2002), quienes observaron en tabaco que los tratamientos con AS, restringieron a la célula epidérmica el movimiento viral a partir del sitio de infección con TMV, pero no con CMV y que el AS inhibe la replicación viral en los protoplastos del mesófilo. Murphy *et al.* (1999), también observaron que el AS puede inhibir la replicación viral, en protoplastos de caupí infectados con AMV, en tejidos de tabaco infectados con TMV y PVX y que en pepino infectado con CMV inhibe la entrada del virus en el floema.

EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE AS SOBRE LA EXPRESION DE SINTOMAS DE TSWV EN UNA INTERACCION PLANTA PATOGENO INCOMPATIBLE

En el híbrido Gol, portador del gen de resistencia Sw5, la aplicación de ácido salicílico antes de la inoculación, redujo el número de lesiones locales y el tamaño de las mismas en las plantas sometidas a estrés térmico. El estrés térmico, incrementó la concentración viral (en los folíolos inoculados a los 5 días después de la inoculación y en el folíolo apical a los 15 días de la inoculación) y el número de folíolos inoculados y apicales positivos 5 días después de la inoculación, el ácido salicílico redujo la concentración viral y el número de folíolos inoculados positivos, es decir que revirtió el efecto predisponente del estrés térmico.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por White, (1979) quien observó que aplicaciones externas de AS, reducían el número y tamaño de las lesiones en *N. tabacum* resistente al patógeno y Yalpani (1991, 1993), quienes observaron que las hojas de tabaco resistente inoculado con TMV desarrollaban menor número de lesiones si se las trataba con AS o sus precursores y que en plantas resistentes a TMV inoculadas con este patógeno y mantenidas a 32 °C, no desarrollaban lesiones locales en el folíolo inoculado, pero sí se observaba la sistematización del virus. Estos autores observaron que la acumulación de AS y la proteína relacionada con la patogénesis PR-1, inducida por TMV estaba inhibida totalmente a 32 °C. Otros resultados coincidentes con los obtenidos por Raskin (1992) (Malamy *et al.*, 1992) quienes aplicando ácido salicílico en forma exógena a las hojas no lograron restaurar la capacidad de inducir reacción hipersensible en plantas mantenidas a 32 °C o en aquellas infectadas a 32 °C y luego mantenidas a 22. Dado que el AS no fue suficiente para desarrollar RH, se dedujo que las altas temperaturas, estarían afectando otros procesos fisiológicos relacionados con la defensa a patógenos.

En interacciones hospedante-patógeno incompatibles, la reacción hipersensible es un evento muy importante para el inicio de la expresión de las reacciones de defensa (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). La alteración de la acumulación de AS en la explosión oxidativa inicial retrasaría la muerte de tejidos infectados que se produce en las lesiones

locales, permitiendo el establecimiento del patógeno (Mur et al, 1997). Esto podría ser la causa del mayor número de lesiones y diámetro de las mismas, que se observa en las plantas del híbrido portador del gen de resistencia Sw5 cuando son inoculadas luego de los tratamientos de estrés térmico. El hecho de que la aplicación de AS atenúe este efecto podría demostrar que dificultades en su acumulación en los tejidos ocasionadas por las altas temperaturas, podrían ser una de las causas del efecto de predisposición a TSWV causado por las mismas.

RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO Y APLICACIONES CON ACIDO SALICILICO SOBRE LA EXPRESION DE SINTOMAS DE TSWV EN UN GENOTIPO DEFICIENTE EN PRODUCCION DE ACIDO SALICILICO

Este experimento se realizó para conocer cómo responde un material mutante *NahG* deficiente en ácido salicílico, comparado con su silvestre Moneymaker y de esa manera poder inferir la intervención de este compuesto en los cambios de predisposición frente a TSWV ocasionados por el estrés térmico.

A los 16 días de la inoculación se observó en el material silvestre, diferencias en susceptibilidad por la aplicación de estrés térmico, en plantas donde no se aplicó ácido salicílico. El mutante *NahG* no manifestó diferencias de susceptibilidad con respecto a los tratamientos de estrés, la aplicación de salicílico atenuó síntomas en las plantas control y una hora después del estrés.

Con respecto al silvestre, el mutante manifestó mayores valores de área bajo la curva de progreso de la enfermedad. Estos datos coinciden con los obtenidos por Zhang (2004), quien encontró que en mutantes de tabaco *NahG* que no acumulan AS, el elicitor PB90 secretado por *Phytophthora boehmerial* no aumentó la resistencia y acumulación de PR-1, efectos observados en el silvestre y Alamillo *et al.*, (2006), quienes encontraron que PPV puede generar infecciones sistémicas en plantas de tabaco que expresan el gen *NahG* pero no en el silvestre.

El silvestre Moneymaker se comportó de manera similar al híbrido susceptible Bonanza en cuanto a que el ácido salicílico redujo el porcentaje de folíolos inoculados y apicales ELISA positivos 5 días después de la inoculación. Esta respuesta fue aleatoria en el mutante *NahG* que degrada el ácido salicílico en catecol.

La falta de respuesta al estrés térmico del mutante deficiente en ácido salicílico podría apoyar la hipótesis de que la predisposición a TSWV en tomate causada por estrés térmico, está relacionada con la imposibilidad de acumular AS, reforzando esta idea se observa menor replicación y sistematización del virus en el silvestre Money maker como resultado de la aplicación de AS, en cambio esta respuesta es aleatoria en el mutante *NahG*.

Los resultados obtenidos demostrarían que en interacciones planta patógeno compatibles específicamente tomate y TSWV, el AS está involucrado en la respuesta a la infección por vías independientes a las que inducen RH. El AS puede también inducir resistencia a virus en plantas que no tienen un gen de resistencia, esto ocurre en ausencia de muerte celular y se traduce en reducción de la cantidad de virus en el tejido infectado y retraso en la aparición de síntomas (White *et al.*, 1983; Chivasa *et al.*, 1997).

Según Huang *et al.*, 2005 en hospedantes susceptibles, los virus que infectan a las plantas inducen la expresión de un conjunto común de genes la mayoría de los cuales están inducidos por AS. La expresión de muchos de estos genes puede compartir componentes de señales involucradas en interacciones incompatibles, pero su expresión incrementada no tiene efectos sobre la expresión viral. Esta última conclusión no coincide con los datos obtenidos en este trabajo ya que sí, se observó disminución en la predisposición a la infección por TSWV, en dos materiales susceptibles luego de aplicar AS.

EFEECTO DEL ACIDO SALICICO SOBRE PARAMETROS PRODUCTIVOS

En los experimentos realizados bajo condiciones controladas, en el híbrido susceptible a TSWV se observó en las plantas inoculadas mayor rendimiento en las plantas control tratadas con AS y menor descarte por virósico en las plantas control y sometidas a estrés. Los tratamientos no modificaron la proporción de frutos comerciales grandes, medianos y

pequeños. En el híbrido resistente a TSWV la aplicación de ácido salicílico generó aumentos de rendimiento total en las plantas inoculadas y sanas a pesar de que no se observaron plantas con síntomas sistémicos, tampoco se observaron cambios en las causas de descarte.

En los experimentos realizados bajo presión de inóculo natural en plantas sometidas a estrés térmico antes del trasplante, las plantas asperjadas con ácido salicílico y que recibieron el efecto del estrés térmico antes del trasplante mostraron mayores rendimientos totales y comerciales tanto en el híbrido susceptible como en el resistente. En el híbrido susceptible la aplicación de ácido salicílico redujo el número de plantas con síntomas de TSWV. No se obtuvieron diferencias para parámetros de crecimiento ni modificaciones en los microorganismos que habitan el filoplano.

En los ensayos bajo condiciones de inóculo natural, pero en plantas no sometidas a estrés térmico antes del trasplante, los tratamientos con ácido salicílico redujeron el porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra” en el híbrido susceptible. En el híbrido resistente no se observó un efecto definido, pero sí es importante el aumento de plantas con síntomas sistémicos registrado en las sucesivas campañas. En las campañas 2004 y 2005, no se obtuvieron diferencias significativas entre el híbrido resistente y el susceptible para plantas ELISA + frente a TSWV a los 60 días del trasplante, pero sí para TCSV/GRSV, con menores porcentajes para el híbrido resistente, esto puede deberse a que las cepas del patógeno contra las cuales el gen de resistencia perdió efectividad, sean mutaciones de TSWV o cepas que formaban parte de la población del patógeno y estén aumentando su frecuencia al aumentar la presión de selección. Este fenómeno se ha detectado en distintos países productores de hortalizas, en el caso del pimiento estos problemas son más acentuados, obligando al productor a controlar el vector, de la misma manera que lo hace cuando cultiva un material susceptible (Picó, 2002; Roggero *et al.*, 2002; Margaria, 2004; Calvo *et al.*, 2008).

Las plantas que recibieron el tratamiento de ácido salicílico mostraron mayor rendimiento total y comercial en las campañas 1999 y 2000, tanto en el híbrido susceptible como en el resistente. El descarte por virósico fue menor en la campaña 2000 para las

plantas asperjadas con ácido salicílico en el híbrido susceptible. El resto de las causas de descarte no mostró diferencias significativas para ninguno de los híbridos.

En las campañas 1999 y 2000 se evaluó el daño causado por *Phytophthora infestans* y *Leveillula taurica* en todas las parcelas, no se obtuvieron diferencias entre plantas tratadas o no con ácido salicílico, tampoco se observaron modificaciones en el desarrollo de microorganismos que habitan el filoplano, ni en el número de agallas ocasionadas por nematodos, ni en el peso seco de las raíces. El híbrido Gol mostró mayores porcentajes de raíces con podredumbres radiculares en las plantas asperjadas con ácido salicílico, en el híbrido Bonanza el efecto fue inverso. Los principales patógenos aislados fueron *Fusarium solani* y *Pyrenochaeta lycopersici*.

Los resultados obtenidos bajo condiciones de inóculo natural coinciden con los de Tally *et al.*, (1999) quienes redujeron la incidencia de plantas de tomate con síntomas de TSWV asperjadas con el ácido benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothioico S-methyl ester (ABM). Estos autores observaron una reducción del número de frutos en relación directa a la cantidad de ABM aplicada por hectárea, pero en el presente estudio no se registraron efectos negativos sobre el crecimiento ni sobre parámetros productivos, por el contrario las consecuencias de la aplicación de ácido salicílico sobre parámetros de rendimiento fueron positivas en el cultivar susceptible y en el resistente, tanto en plantas inoculadas como en las sometidas a inóculo natural.

Este efecto benéfico del AS tanto en el híbrido susceptible como en el resistente podría deberse a la acción de defensa generada en el cultivo por este inductor sobre otros patógenos distintos a TSWV o efectos fisiológicos vinculados al estrés del transplante u otro tipo de condiciones subóptimas de origen abiótico como el estrés térmico (Borsani *et al.*, 2001; Dat *et al.*, 1998 a y b; Dat *et al.*, 2000; Janda *et al.*, 1999; Wang y Li, 2005; Senaratna *et al.*, 2000; Szepesi *et al.*, 2005).

Así como el ácido salicílico activa la RSA, existen otros inductores químicos como carbohidratos, ácido salicílico, ácidos grasos, jasmonatos, aminoácidos, etileno, glucoproteínas, derivados de levaduras, metabolitos microbianos, así como inductores

abióticos o semisintéticos, algunos ejemplos son el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) o el ácido benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothioico S-methyl ester (ABM, BION[®]) y el ácido L- α -amino butyrico (ABA) que son independientes del AS (Sticher *et al.*, 1997; Kessmann *et al.*, 1994; Malamy *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 1996; Görlach *et al.*, 1996; Lyon y Newton, 1999; Zhu *et al.*, 2003; Bovié *et al.*, 2004; Guzzo, 2004; De Nardi *et al.*, 2006, Piris *et al.*, 2007).

Existen antecedentes sobre el uso agrícola de activadores de resistencia como el acibenzolar metil, con buenos resultados en cuanto a la reducción de la incidencia de algunas enfermedades como PVY en papa y tabaco (Ruess, 1998), TSWV en tomate (Tally *et al.*, 1999), *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* en pimiento (Romero *et al.* 2001), *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* pv *tomato* en tomate (Louws *et al.* 2001), *Rotylenchulus reniformis* y *Meloidogyne* en *Ananas comosus* (Chinnasri *et al.*, 2006).

El uso de inductores de resistencia podría tener mayor utilidad en cultivos bajo cubierta donde es más sencillo monitorear y modificar determinadas variables ambientales (temperatura, humedad relativa) y donde podrían combinarse con el uso de biocontroladores en el marco de un manejo integrado de plagas y enfermedades (Lyon y Newton, 2000; Staub 2001; USDA, 2003; Hoover, 2004). Si bien en este trabajo no se observaron síntomas sistémicos en el híbrido de tomate portador del gen Sw5 como efecto de la aplicación de estrés térmico, sí se observó que la aplicación de AS a plantas estresadas lograba revertir los efectos de las altas temperaturas en cuanto a reducir el número y tamaño de las lesiones locales, la concentración viral y sistematización del patógeno. Moury *et al.* (1998), observaron que la resistencia a TSWV conferida por el gen Tsw en pimiento es menos estable a 32 °C que a 22 °C y Soler *et al.* (1998), informaron una mayor susceptibilidad a regímenes de 30/18 °C (día/noche) que 25/18 °C, en poblaciones de *Capsicum chinense*, resistentes a TSWV. Estos antecedentes permiten especular sobre el uso que podrían tener los activadores de resistencia si se hallaran momentos óptimos de aplicación a los fines de mejorar la expresión de genes de resistencia con dificultades para manifestar su efecto a altas temperaturas: de esa manera se evitaría la aparición de quiebres de la resistencia. Este fenómeno se observa ultimamente en distintos

países productores de hortalizas incluido nuestro país, en el caso del pimiento estos problemas son más acentuados, obligando al productor a controlar el vector, de la misma manera que lo hace cuando cultiva un material susceptible (Picó, 2002; Roggero *et al.*, 2002; Margaria, 2004; Calvo *et al.*, 2008).

Como resumen de los resultados expuestos, se puede sugerir que las dificultades en acumular ácido salicílico que presentan las plantas expuestas a altas temperaturas, las privaría de un componente esencial en el normal inicio de los mecanismos de defensa frente al ataque de un patógeno. La relación entre el efecto predisponente del estrés térmico y el ácido salicílico se observó en el híbrido resistente y no en el susceptible debido posiblemente a que el primero posee un gen de resistencia responsable de desencadenar esta respuesta de defensa y por ende se vería más influenciado por los cambios generados en el contenido endógeno de AS, ya sea por efecto de la aplicación de altas temperaturas como por su aplicación exógena. En el híbrido susceptible no existe este mecanismo de resistencia por lo que el efecto predisponente del estrés térmico se vería explicado por otros cambios sufridos por el hospedante, como podrían ser alteraciones en el sistema antioxidante.

El uso en agricultura de resistencia inducida mediada por inductores químicos, aplicados al cultivo en una especie de “preinmunización” ha sido discutida en los últimos años. La aplicación de estas sustancias se incluye dentro de un paquete de prácticas culturales que contribuyen al manejo racional de plagas y enfermedades. El uso de estos compuestos podrían ser cuestionados si se considera que en algunos casos pueden ocasionar fitotoxicidad o reducciones en el rendimiento, o representar una tecnología demasiado costosa. Los datos obtenidos en este trabajo podrían contribuir para determinar, cuál es la etapa del cultivo de tomate en que puede utilizarse el activador para contribuir al manejo integrado de TSWV, sin ocasionar efectos no deseados sobre parámetros de crecimiento y producción o aumentar la susceptibilidad a otras enfermedades o plagas que pueden estar reguladas por otros mecanismos y que la vía del salicílico pueda influir negativamente.

Como resultado de este trabajo, se propone una ventana de oportunidad para la aplicación de AS. La misma comprendería desde el trasplante hasta 45 días posteriores, etapa en que este compuesto podría aplicarse para reducir la incidencia de virosis, obteniéndose aumentos en el rendimiento y sin resultados negativos sobre otros problemas sanitarios que afectan al cultivo.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos indican, que el ácido salicílico está involucrado en la resistencia del cultivo de tomate a esta enfermedad de origen viral. En el híbrido susceptible la vinculación de este efecto con el ocasionado por el estrés térmico, no queda clara como resultado de estos ensayos. En el híbrido resistente el AS atenuó el aumento en el número y tamaño de lesiones locales y disminuyó la sistematización del virus, ambos efectos ocasionados por el estrés térmico.

Las plantas sanas del híbrido susceptible tratadas con AS mostraron mayor rendimiento comercial. La aplicación de ácido salicílico generó aumentos de rendimiento total en las plantas del híbrido susceptible inoculadas, pero no sometida a estrés y menores descartes por virósico en plantas estresadas y control, mientras que en el híbrido resistente el AS provocó aumentos de rendimiento en las plantas inoculadas y sanas a pesar de que no se observaron plantas con síntomas sistémicos.

El mutante *NahG*, que tiene inhibida su posibilidad de acumular AS, no manifestó diferencias de susceptibilidad con respecto a los tratamientos de estrés como sí lo hizo el silvestre, la aplicación de salicílico atenuó síntomas en las plantas control y una hora después del estrés. Con respecto al silvestre, el mutante manifestó mayores valores de área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

El silvestre Moneymaker se comportó de manera similar al híbrido susceptible Bonanza en cuanto a que el ácido salicílico redujo el porcentaje de folíolos inoculados y apicales ELISA positivos 5 días después de la inoculación. Esta respuesta fue aleatoria en el mutante *NahG* que degrada el ácido salicílico en catecol

En condiciones de inóculo natural, los tratamientos con ácido salicílico redujeron el porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra” en el híbrido susceptible Bonanza en las 4 campañas sin provocar síntomas de fitotoxicidad, ni aumentos en la incidencia de agallas por gramo de materia seca de raíz, podredumbres radiculares, muerte de plantas después del trasplante ni diferencias en el rendimiento. La aplicación de AS tuvo efectos benéficos en el rendimiento de plantas susceptibles y resistentes a TSWV transplantadas antes de estar sometidas a estrés térmico.

CAPÍTULO 4

RELACIÓN ENTRE EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES CON EL INCREMENTO EN PREDISPOSICIÓN A TSWV CAUSADA POR LA EXPOSICIÓN A ALTAS TEMPERATURAS

ANTECEDENTES

ROL DE LAS ESPECIES ACTIVAS DE OXÍGENO Y EL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES COMPATIBLES E INCOMPATIBLES ENTRE PATÓGENOS Y PLANTAS

La liberación de especies activas del oxígeno (EAOs) es una reacción de las células bajo estrés, entre ellos el estrés térmico (Dat *et al.*, 1998; Edreva, 2005; Rizhsky; 2002; Rivero *et al.*, 2003) y además una característica común en interacciones planta-patógeno compatibles e incompatibles (Bolwell, 1998; Bolwell, 2002). En estas últimas, la resistencia del hospedante se basa en un primer reconocimiento del patógeno por la planta, seguido por una rápida explosión oxidativa, con la acumulación de H_2O_2 (Mehdy, 1994; De Gara *et al.*, 2003; Lee y Hwang, 2005) y una respuesta hipersensible (RH), disparada por este último (Dangl *et al.*, 1996; Raskin, 1992; Baker *et al.*, 1997; Yakimova *et al.*, 2006), que involucra la muerte programada de células (MCP) y la activación coordinada de una batería de mecanismos de defensa, que impiden el progreso de la infección.

Existe una compleja relación entre la liberación de EAOs y la activación del sistema antioxidante, durante el desarrollo de los procesos fisiológicos involucrados en la respuesta del hospedante a la infección por parte de patógenos. Las EAOs activan la muerte celular programada (Hoeberichts y Woltering, 2002; Yakimova *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006) a altas concentraciones, pero inducen la síntesis de antioxidantes a bajas dosis (Hoeberichts y Woltering, 2002). Los antioxidantes inhiben la expansión de áreas necróticas que

facilitan la penetración de fitopatógenos necrotróficos, por lo tanto el éxito de la reacción hipersensible dependerá de la supresión de los sistemas de eliminación de especies activas del oxígeno y del desbalance del estado redox celular (De Gara *et al.*, 2003). Recientemente, se ha encontrado una relación entre este estado y la regulación de la inducción de resistencia sistémica adquirida (RSA) por ácido salicílico (AS). Esta relación estaría basada en que es necesaria la reducción de dos residuos de cisteína de la proteína NPR1, que a su vez debe unirse a la forma reducida del factor de transcripción TGA1 para la activación de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (Fobert y Després, 2005). La aplicación exógena de AS aumentaría la relación entre las formas oxidadas y reducidas de glutatión, el principal regulador del estado redox celular (Fobert *et al.*, 2008).

Los cambios inducidos en la expresión de los genes responsables del sistema antioxidante, modificarían la capacidad de respuesta de la planta a estrés de origen biótico y abiótico. Esto se refleja en estudios realizados sobre plantas transgénicas, algunos ejemplos se exponen a continuación:

La sobreexpresión de la enzima ascorbato oxidasa en el apoplasto de tabaco transgénico, alteró el estado redox del ascorbato y el glutatión y aumentó la sensibilidad frente al ozono (Sanmartín *et al.*, 2003). Plantas transgénicas de tabaco y tomate que sobreexpresan CAT, resultaron más tolerantes al estrés fotooxidativo ocasionado por el paraquat, la sequía y el frío (Edreva, 2005). En suspensiones de células de tomate la exposición al cadmio indujo MCP mientras que antioxidantes, incluida la enzima catalasa la inhibieron (Yakimova *et al.*, 2006). También en plantas de tomate que sobreexpresan ácido clorogénico, un fenol antioxidante, se observaron lesiones reducidas al inocularse con *Pseudomonas syringae* (Niggeneg *et al.*, 2004). Plantas de pimiento que sobreexpresan APX1 mostraron mayor tolerancia al estrés oxidativo ocasionado por methyl viológeno y mayor resistencia a *Phytophthora nicotianae* (Sarowar *et al.*, 2005). Plantas transgénicas de festuca con mayores propiedades antioxidantes, por sobreexpresar las enzimas chalcon sintasa, chalcon isomerasa y dihidroflavonol reductasa, involucradas en la ruta flavonoide de la vía del fenilpropano, mejoraron su resistencia a *Fusarium* (Lorenc-Kukula *et al.*, 2007).

Otro ejemplo de la interacción entre el sistema antioxidante y la RH se obtuvo gracias al estudio de los biofotones que se emiten transitoriamente durante el desarrollo de la reacción hipersensible, como resultado de la excitación de moléculas como la clorofila por parte de las especies activas del oxígeno (Kobayashi *et al.*, 1997). La distribución espacio temporal de estas emisiones permite estudiar el desarrollo de la RH, por ejemplo, luego de inocular plantas de caupí con CMV, durante el desarrollo de la RH, Kobayashi *et al.* (2007), detectaron la emisión de biofotones a las 10-16 hs de la inoculación, ésta podía ser suprimida mediante la aplicación de Tiron (ácido disulfónico) que tiene la propiedad de capturar las EAOs.

Algunos de los antecedentes expuestos anteriormente indicarían que la sobreexpresión del sistema antioxidante u otros mecanismos que capturan las EAOs, ayudarían a las plantas a responder al estrés abiótico y al ataque de patógenos una vez establecida la infección, pero inhibiría la MCP, que es parte de la respuesta de resistencia.

Existen antecedentes sobre la evolución de las especies activas del oxígeno y la actividad de enzimas antioxidantes en distintas interacciones planta-patógeno.

A) En interacciones planta patógeno compatibles

Yi *et al.* (1999) encontraron que en plantas de tabaco resistentes, la infección de TMV, redujo transitoriamente la transcripción y actividad total catalasa, coincidentemente con la acumulación de AS, en las cercanías de la RH; la aplicación exógena de AS, ABM o H₂O₂, ejerció el mismo efecto (Yi *et al.*, 2003). Esta reducción de la actividad catalasa estaría relacionada a la activación de los sistemas de defensa en los que está involucrado el H₂O₂.

Király *et al.* (2002), estudiaron el estado antioxidante en hojas de dos materiales de tabaco que generan lesiones locales luego de la infección con TMV, la var Xanthi-nc, portadora del gen N, que otorga resistencia a TMV y el mutante NahG transgénico, que no es capaz de acumular AS y no puede desarrollar RSA. La actividad de las enzimas SOD, CAT, POX, GST, GR y polifenol oxidasa (PPO) era mayor en hojas del material Xanthi-nc que en el material NahG, en cuyas plantas la aplicación exógena de AS no logró aumentar

la actividad antioxidante. Según estos autores, la represión del sistema de defensa antioxidativo durante la interacción de plantas con patógenos necrotizantes podría contribuir a la muerte celular y ser la causa del desarrollo de grandes necrosis en las plantas *NahG*. La inducción temprana de antioxidantes en el desarrollo de SAR, reduciría la necrosis luego de la infección con TMV, pero no tendría una relación directa con la respuesta de defensa. Estos autores encontraron además que la aplicación de SOD y CAT suprimió la necrosis causada por TMV después de aplicar generadores de EAOs.

Otro ejemplo de la interacción entre la respuesta de un gen de resistencia, la liberación de EAOs y el sistema antioxidante es el de Tománková *et al.* (2006), quienes encontraron intensa producción de H₂O₂ en materiales de tomate resistentes a *Oidium neolycopersici* correlacionada con alta actividad peroxidasa y ascorbato peroxidasa. El material moderadamente resistente *L. chmielewskii* presentaba mayor actividad catalasa.

Raj y Shetty (2008), estudiaron en plántulas de mijo los cambios histoquímicos originados luego de la infección causada por *Sclerospora graminicola*, en cv resistentes, susceptibles o tratados con la bacteria promotora del crecimiento *Bacillus pumilus*, la cual induce resistencia al patógeno. El examen de los tejidos inoculados mostró una acumulación mucho más temprana de lignina, calosa y H₂O₂, en los materiales resistentes o inducidos a resistencia por la bacteria.

Ruocco *et al.* (2008), encontraron que la proteína Hytral secretada por *Trichoderma* activó respuesta hipersensible en hojas de tomate, así como reacciones locales y sistémicas de resistencia a la infección por patógenos. A bajas dosis esta proteína también activó al sistema antioxidante, según los autores la modulación de la acumulación de EAOs como aniones superóxido y peróxido jugaría un importante rol en la transmisión de señales de defensa.

Un ejemplo claro de cómo influyen en el proceso de la infección las modificaciones en la capacidad de liberar EAOs del hospedante se plantea en el trabajo de Nakajima *et al.*, (2008), estos autores aislaron una cepa avirulenta de *Botrytis cinerea* que ha perdido su patogenicidad, el comportamiento de esta cepa, es igual al de las virulentas a excepción de

que su infección genera una reacción hipersensible en las hojas de tomate. Los autores encontraron acumulación de H_2O_2 en las células epidérmicas infectadas por la cepa avirulenta, pero cuando se adicionó ácido ascórbico o un inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, con el objetivo de eliminar el H_2O_2 no se observó la reacción de hipersensibilidad pero sí se encontraron hifas del patógeno en el mesófilo.

Otra interacción similar a la descrita en el párrafo anterior, en que se modificó la respuesta del hospedante frente a una infección al alterar la capacidad de liberar EAOs, se puede apreciar en el trabajo de Basavaraju *et al.*, (2008). Estos autores observaron que la infección de sorgo con *Colletotrichum sublineolum* produjo una explosión oxidativa con acumulación de aniones superóxido y H_2O_2 a las 12 y 48 hs de la inoculación respectivamente, en los cvs resistentes y moderadamente resistentes, pero no en los susceptibles. Esta reacción se redujo, al mismo tiempo que se observó aumentos en la severidad de la infección en los tres cultivares cuando se infiltró los tejidos con un inhibidor de la enzima NADPH oxidasa o con catalasa para capturar el H_2O_2 .

B) En interacciones planta patógeno compatibles

Menos atención se ha dado al rol de las EAOs y el sistema antioxidante en interacciones planta-patógeno compatibles (Stone, 2000; Venisse, 2001; Riedle- Bauer M., 2000). Harrach *et al.*, (2005), midieron la actividad de varios compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en cvs de cebada con diferentes grados de resistencia a *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* y detectaron un incremento en la actividad del sistema antioxidante. El cultivar susceptible mostró las mayores diferencias con respecto al control, mientras que el cv. resistente registró diferencias en menor medida. Según estos autores el sistema antioxidante en la reacción susceptible, se induciría para proteger al patógeno de los efectos deletéreos de las EAOs que se producen durante la reacción de defensa de la planta.

Escaler *et al.* (2000), observaron inducción de la enzima glutatión reductasa, en tejido de embriones de arveja exhibiendo replicación activa de “pea seed borne mosaic potyvirus” (PSbMV). Por otra parte, Musetti *et al.* (2004), estudiaron la evolución del

contenido de H₂O₂ en hojas de manzano recuperadas después de la infección con “apple proliferation phytoplasma” (APP). Estos autores encontraron que las plantas recuperadas, mostraban altas concentraciones de H₂O₂ en las hojas donde no se podía detectar al patógeno pero no en las raíces donde éste seguía presente, mientras que las plantas sanas no acumulaban peróxido. Los autores relacionaron la presencia de H₂O₂ con la imposibilidad del patógeno de dispersarse y replicarse, pero no con la explosión oxidativa propia de un gen de resistencia, ya que en esta última el peróxido se eliminaría rápidamente de los tejidos.

En este mismo sentido Deller *et al.*, (2008), encontraron acumulación de H₂O₂ y anión superóxido en hojas infectadas de trigo susceptible a *Mycosphaerella graminicola*, con concentraciones crecientes a medida que aumentaba la severidad de los síntomas y asociado a la presencia de los cuerpos de fructificación del patógeno.

Según Chang (2005), la luz y el metabolismo de la EAOs en los cloroplastos serían importantes en la resistencia basal contra patógenos virulentos; líneas transgénicas con expresión reducida de 7 isoformas cloroplásticas de la enzima glutatión peroxidasa (GPX), y un mutante que anula la GPX7, fueron más sensibles al estrés fotooxidativo pero mostraron menor crecimiento bacteriano cuando fueron inoculadas con razas virulentas de *Pseudomonas syringae* pv tomato DC 3000 y *Ps.t. maculicula* raza S4326, indicando mayor resistencia a patógenos, estos resultados se contradicen con los de Niggeneng *et al.* (2004), quienes encontraron reducción de las lesiones ocasionadas por *Pseudomonas syringae*, en plantas transgénicas que sobreexpresan un fenol antioxidante.

Díaz Vivancos *et al.* (2006), estudiaron los cambios en el sistema antioxidante del apoplasto foliar en especies de *Prunus* según su susceptibilidad a Plum pox virus (PPV). En un cv de duraznero muy susceptible, se observó un aumento de actividad APX1, POX, NADH-POX y PPO, en un cultivar de damasco susceptible, se observó baja actividad POX y SOD y alta actividad PPO y en un de damasco resistente, se observó alta actividad APX1, POX y SOD. La infección prolongada de PPV produjo estrés oxidativo y aumento en la concentración de H₂O₂, estos cambios fueron más acentuados en el material

susceptible, (donde se observó pérdida de electrolitos), que en el resistente donde el H₂O₂ aumentó en el apoplasto pero no se registraron daños a las células.

Li y Burritt (2003), compararon el metabolismo antioxidante de plantas susceptibles de *Dactylis glomerata* L. que nunca se infectaron con Cocksfoot mottle virus (CfMV) y plantas totalmente recuperadas de una infección, donde el virus no estaba ya presente y las plantas mostraban inmunidad frente a la enfermedad. Mientras que en las plantas susceptibles, los niveles de H₂O₂ disminuyeron luego de la inoculación para luego aumentar junto con la peroxidación de lípidos y avance de síntomas; las plantas recuperadas mostraron un leve incremento de H₂O₂, pero sin aumento en la peroxidación de lípidos. La inoculación de plantas susceptibles disminuyó las formas oxidadas de ascorbato y glutatión y el pool de glutatión, la actividad CAT aumentó a los 5 días de la inoculación. La actividad antioxidante tuvo una respuesta bifásica en respuesta a CfMV en plantas susceptibles, disminuyó a inicios del establecimiento viral pero aumentó posteriormente en respuesta al daño celular. En plantas recuperadas sólo se observaron aumentos momentáneos de actividad APX, dehidroascorbato reductasa (DHAR) y monodehidroascorbato reductasa (MDHAR).

En el trabajo de Aver'yanov *et al.* (2008), se expone un ejemplo de cómo interactúan los sistemas antioxidantes de hospedantes y patógenos y cómo modifican la liberación de EAOs y el proceso de infección. Se estudió la formación de EAOs y expresión de enzimas antioxidantes en el sitio de la infección en las interacciones compatibles arroz-*Magnaporthe grisea* y pepino-*Cladosporium cucumerinum* y se observó que la germinación de las esporas podía contribuir a una gran parte de la producción de anión superóxido y de H₂O₂ y que tanto el patógeno como el hospedante producían EAOs y enzimas antioxidantes. Los autores concluyen que mientras la actividad antioxidante aumentó la compatibilidad entre patógeno y hospedante, este último trataría de inactivar a enzimas antioxidantes que no provienen de su organismo y que la fase líquida en el sitio de la infección muestra actividades opuestas pro-oxidantes/antioxidantes cuyo balance es probablemente determinante en el desarrollo de resistencia adquirida o inducida a enfermedades.

RELACIÓN ENTRE EL INCREMENTO EN PREDISPOSICIÓN A ENFERMEDADES VIRALES CAUSADA POR LA EXPOSICIÓN A ALTAS TEMPERATURAS, LOS CAMBIOS EN ACUMULACIÓN DE ESPECIES ACTIVAS DE OXÍGENO Y LA EXPRESIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE

Las células bajo estrés térmico reaccionan liberando especies activas del oxígeno (Dat *et al.*, 1998), activando enzimas antioxidantes y sintetizando proteínas como las de choque térmico (Ding *et al.*, 2001), que también tienen la función de preservar la maquinaria celular de los efectos nocivos del estrés (Taiz y Zeiger, 1998; Rizhsky, 2002). En tomate, por ejemplo, plantas sometidas a 35 °C mostraron mayor concentración de H₂O₂ y expresión de la enzima superóxido dismutasa (SOD) férrica en hojas comparado con un control mantenido a 25 °C, así como menor expresión de la enzima catalasa (CAT)(Rivero *et al.*, 2003).

Király *et al.*, 2002, estudiaron los efectos de la aplicación de generadores de EAOs, en plantas de tabaco resistentes e inoculadas con TMV y sometidas a altas temperaturas. La aplicación de los sistemas riboflavina/metionina y glucosa/glucosa oxidasa o H₂O₂, indujeron necrosis tipo respuesta hipersensible a 30 °C, pero las plantas infectadas sin tratar, o tratadas pero sin inocular, no desarrollaron RH. La aplicación de SOD y CAT suprimió la necrosis causada por TMV a 20 °C o a 30 °C después de aplicar generadores de EAOs. La concentración de TMV a 20 °C fue menor que a 30 °C aunque a esa temperatura se haya generado necrosis con generadores de EAOs, según los autores la concentración viral depende de la temperatura más que de la necrosis tipo RH, por lo que la resistencia a virus podría ser independiente de esta reacción.

Esta independencia entre necrosis tipo RH y resistencia a virus es reafirmada por Cole *et al.*, 2001, quienes encontraron tres tipos diferentes de reacciones frente a la infección por CMV en especies de *Nicotiana*: *N. glutinosa* es resistente a la cepa W260 y responde con lesiones cloróticas locales no necróticas, *N. clevelandii* responde mediante muerte celular sistémica y *N. edwardsonii* un híbrido entre ambas, responde mediante RH.

La habilidad para ajustar el sistema antioxidante a concentraciones cambiantes de EAOs puede ser vital para todas las especies bajo estrés (Janda, 2005), la resistencia de la planta a estas condiciones dependerá de su capacidad de detoxificar las EAOs (De Gara *et al.*, 2003). Por otra parte la liberación de EAOs forma parte de la respuesta de la planta frente a patógenos; se ha observado aumento o disminución de la concentración de H₂O₂ en materiales resistentes e inmunes (Tománková *et al.*, 2006; Li y Burritt, 2003) y altos contenidos tanto en plantas susceptibles recuperadas de una infección (Musetti *et al.*, 2004) como en plantas manifestando susceptibilidad (Li y Burritt, 2003).

Resulta difícil extraer conclusiones de trabajos realizados en distintos sistemas planta patógeno y con distintas enzimas antioxidantes, hasta este punto se ha expuesto que en interacciones planta patógeno incompatibles en las cercanías de la RH se redujo la actividad CAT, (Yi *et al.*, 1999) pero que en términos generales la mayor expresión del sistema antioxidante condujo a la reducción de lesiones locales, muerte celular programada y respuesta hipersensible (Niggeneg *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2007; Király *et al.*, 2002; Díaz Vivancos *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2008; Basavaraju *et al.*, 2008), la cual no está necesariamente relacionadas a la resistencia frente a patógenos (Cole, 2001; Király, 2002). y aumentó la resistencia a determinados patógenos como *Phytophthora nicotianae* y *Fusarium spp.* (Sarowar *et al.*, 2005; Lorenc-Kukula *et al.*, 2007).

Por otra parte en interacciones planta patógeno compatibles, el H₂O₂ también tendría un rol al alterar el establecimiento del patógeno en los tejidos del hospedante (Escaler *et al.*, 2000), habría una relación entre la acumulación de H₂O₂ (Li y Burritt, 2003; Deller *et al.*, 2008; Díaz Vivancos *et al.*, 2006), el aumento de la actividad antioxidante y el avance de determinadas infecciones (Harrach, 2005; Escaler *et al.*, 2000; Díaz Vivancos *et al.*, 2006; Li y Burritt, 2003) con resultados contradictorios en algunos casos (Chang, 2005 y Niggeneg, 2004). La modulación del sistema antioxidante también alteraría el grado de susceptibilidad en hospedantes susceptibles, ya que el incremento en la actividad antioxidante aumentaría la compatibilidad entre patógeno y hospedante (Aver'yanov *et al.*, 2008).

No es posible inferir a través de alguno de estos estudios si la acción del H_2O_2 y la actividad del sistema antioxidante frente a la infección del patógeno es parte de una respuesta de resistencia del hospedante o consecuencia de su presencia en los tejidos. En términos generales la mayor expresión del sistema antioxidante condujo a la reducción de lesiones locales, muerte celular programada y respuesta hipersensible y alteraría el grado de susceptibilidad del hospedante en interacciones compatibles, ya que evitaría la acumulación de H_2O_2 en el sitio de la infección, la cual es necesaria para la respuesta del hospedante frente al patógeno. Los antecedentes expuestos se basan principalmente en eventos observados luego de la inoculación, existen pocos estudios que caracterisen el efecto del aumento de H_2O_2 y los cambios en la actividad antioxidante antes de la infección y su relación con el posterior desarrollo de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Los mecanismos de defensa ante la infección viral, en plantas sometidas a estrés térmico, dependen de un incremento de especies activas de oxígeno (EAOs), específicamente H_2O_2 .

Genotipos deficientes en la producción de H_2O_2 serán particularmente susceptibles a la infección viral.

Las altas temperaturas previas a la infección, inducen en el hospedante aumentos en susceptibilidad a las infecciones, en coincidencia con incrementos en la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT).

OBJETIVOS

Describir los efectos de aplicaciones exógenas de H_2O_2 sobre la susceptibilidad a la infección por TSWV, en plantas provenientes de tratamientos de estrés térmico de cultivares de tomate resistentes y susceptibles a este patógeno.

Evaluar la susceptibilidad frente a TSWV de plantas de tomate deficientes en la producción de H_2O_2 , sometidas a estrés térmico previo a la inoculación.

Describir los efectos de los tratamientos de estrés térmico sobre la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT) antes de la inoculación, en hojas de cultivares de tomate resistentes y susceptibles al patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES GENÉTICOS UTILIZADOS

Para las experiencias, se utilizaron dos materiales genéticos comerciales de tomate, ya probados en diferentes épocas de cultivo y condiciones de manejo: Gol, heterocigota para el gen Sw5 que confiere resistencia a tospovirus y Bonanza, susceptible, ambos con similar estructura de planta y tipo de fruto (hábito de crecimiento indeterminado, fruto redondo de firmeza estructural) (Mitidieri *et al.*, 1996, 2001). También se utilizó un genotipo de tomate deficiente en la producción de H₂O₂. Este mutante subexpresa la enzima NADPH oxidasa (Silvestre=Motelle), responsable de la liberación de ión superóxido y consecuentemente peróxido, al apoplasto y fue cedido por el Dr. Robert Fluhr, Weizmann Institute of Science, Rehovoth, Israel.

PROCEDIMIENTOS COMUNES A TODOS LOS EXPERIMENTOS

Obtención de plantines, preparación del inóculo, aplicación de los tratamientos de estrés (Ver Capítulo 2)

TRATAMIENTOS CON H₂O₂

Una vez finalizados los tratamientos de estrés y estabilizada la temperatura foliar, se asperjó las plantas con una solución de peróxido de hidrógeno 5 mM + 1µl de Tween 20.

VARIABLES DE RESPUESTA

Evaluación de la enfermedad, progreso de la enfermedad, pruebas de diagnóstico (Ver Capítulo 2)

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CATALASA Y SUPERÓXIDO DISMUTASA

Se extrajeron 2 folíolos de la primera hoja desarrollada después del ápice de 5 plantas por tratamiento. Las muestras se extrajeron a 1, 4, 8 y 24 horas de finalizado el estrés térmico, también se extrajeron muestras al testigo mantenido a 25 °C.

Se homogeneizó tejido congelado de lámina 1/10 p/v en tampón fosfato de K 50 mM pH 7.4, con EDTA 1 mM, y PVPP 1/1 p/Pf, para la determinación de CAT y SOD. Los extractos fueron centrifugados a 10000g durante 30 minutos, a 4°C. Se midió la actividad de las enzimas inmediatamente.

La actividad CAT fue medida por disminución en la absorbancia a 240 nm en tampón fosfato de K 50 mM pH 7.4 T° ambiente, iniciando la reacción con H₂O₂ 5 mM de concentración final en el medio de reacción (Gallego *et al.*, 1996).

La actividad SOD fue determinada por absorbancia a 560nm (Beauchamp y Fridovich, 1971). Una unidad SOD fue definida como la cantidad de enzima capaz de inhibir al 50 % la foto-reducción del NBT, usando riboflavina y luz como fuente de superóxido. La mezcla de reacción estuvo compuesta por tampón fosfato de potasio 50 mM pH 7.4, metionina 13 mM, NBT 75 µM, EDTA 100 nM y riboflavina 4 µM aproximadamente. La mezcla fue calibrada en ausencia de la enzima con concentraciones de riboflavina entre 2 µM y 20 µM para alcanzar un valor de absorbancia de 0.25 a 560 nm después de 8 minutos de incubación en luz de 360 nm a T° ambiente.

DISEÑO ESTADISTICO Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Ver Capítulo 2

RESULTADOS

MODIFICACION DEL EFECTO PREDISPONENTE DEL ESTRÉS TÉRMICO POR APLICACIONES EXOGENAS DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

A) Híbrido susceptible a TSWV Bonanza

En las figuras 4.1 y 4.2 se observa la evolución de síntomas de TSWV y el porcentaje de folíolos ELISA positivos en plantas inoculadas a distintos tiempos luego de la aplicación de estrés térmico con y sin aplicación exógena de H₂O₂.

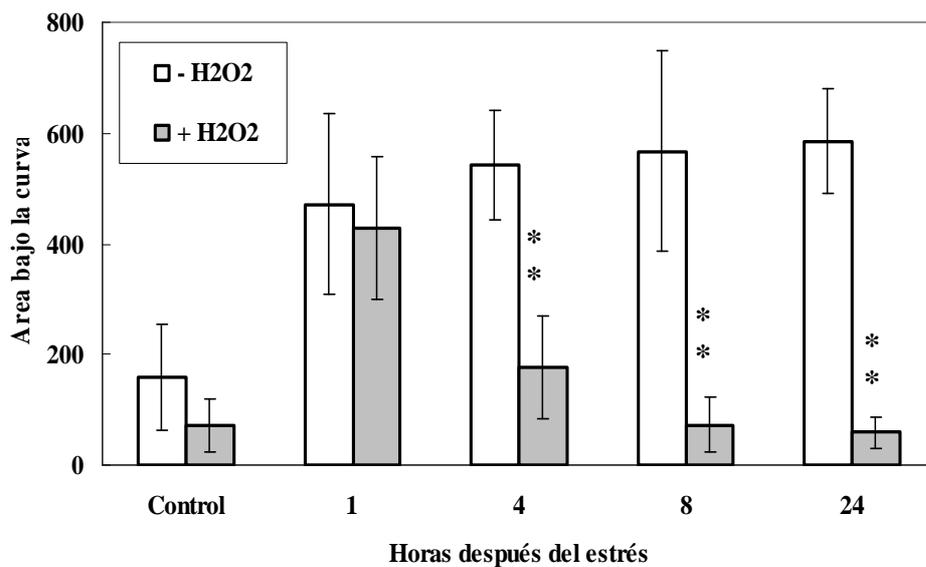


Figura 4.1 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de H₂O₂. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Se muestran medias de una repetición.

Plantas de tomate inoculadas con TSWV 24, 8, 4 y 1 hora después del estrés térmico (40 °C) y de la aplicación de peróxido de hidrógeno 5 mM. Control= 25 °C. * Contraste estadísticamente significativo (P< 5%) entre tratamientos con y sin peróxido. ** Contraste estadísticamente significativo (P< 1%) entre tratamientos con y sin H₂O₂.

En el híbrido susceptible Bonanza la aplicación de H₂O₂ luego de someter las plantas a altas temperaturas pero antes de la inoculación redujo la severidad de síntomas sistémicos en el testigo y en las plantas inoculadas 4, 8 y 24 horas después del estrés térmico, pero no en el período una hora posterior al mismo donde aún persiste su efecto predisponente a TSWV según resultados descritos en capítulos anteriores, la interacción peróxido*estrés térmico fue significativa para la variable área bajo la curva de progreso de la enfermedad (Fig 4.1, Ver Anexo Tabla 4.1).

A

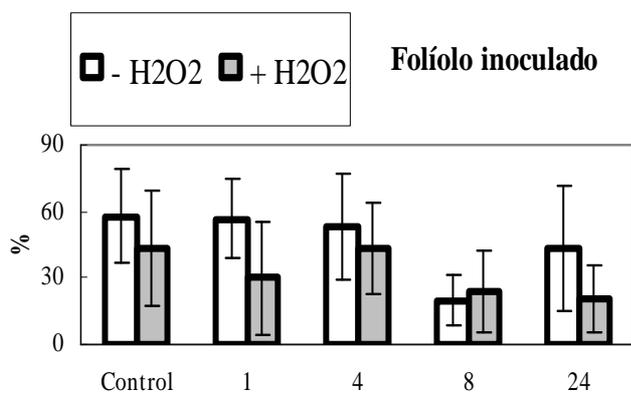
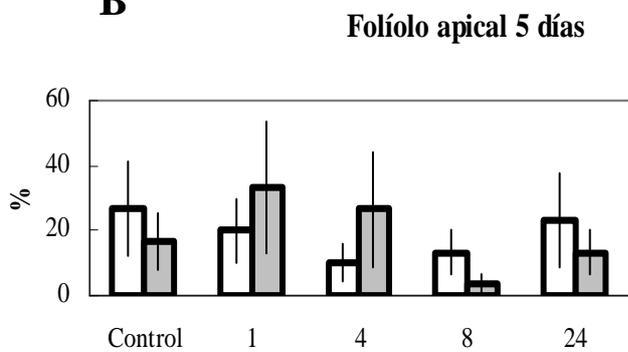


Figura 4.2 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de H₂O₂. Porcentaje de folíolos ELISA positivos. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

B



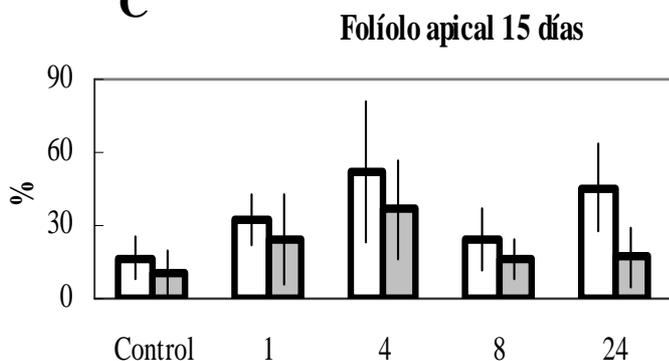
A Porcentaje de folíolos inoculados ELISA positivos 5 días después de la inoculación. Se muestran medias de una repetición.

B Porcentaje de folíolos apicales ELISA positivos a los 5 días de la inoculación. Se muestran medias de una repetición.

C Porcentaje de folíolos apicales ELISA positivos a los 15 días de la inoculación. Datos promedio de tres ensayos.

Plantas de tomate inoculadas con TSWV 24, 8, 4 y 1 hora después del estrés térmico (40 °C) y de la aplicación de peróxido de hidrógeno 5 mM. Control= 25 °C.

C



La aplicación de H₂O₂ redujo el porcentaje de folíolos ELISA positivos inoculados a los 5 días de la inoculación (P< 1%) en todos los tratamientos (salvo 8 horas después del estrés) y apicales a los 15 días de la inoculación (P< 5%)(Ver Anexo Tabla 4.2). El porcentaje de folíolos apicales ELISA positivos, 5 días después de la inoculación no disminuyó en las plantas inoculadas 1 y 4 horas después del estrés, pero sí en las plantas control y en las inoculadas 8 y 24 horas después del mismo (Fig 4.2).

B) En el híbrido resistente a TSWV Gol

En la figura 4.3 se observa el número y diámetro de lesiones locales en el folíolo inoculado, 15 días después de la inoculación, en plantas inoculadas a distintos tiempos luego de la aplicación de estrés térmico con y sin aplicación exógena de H₂O₂.

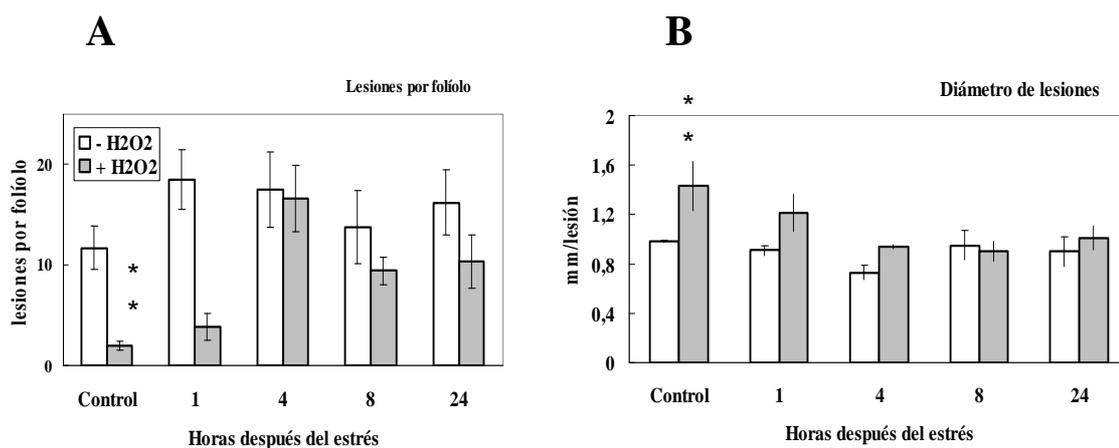


Figura 4.3 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de H₂O₂. Número (A) y diámetro (B) de lesiones locales en el folíolo inoculado, 15 días después de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV. Se muestran datos de una repetición.

** Contraste estadísticamente significativo (P < 1%) entre tratamientos con y sin peróxido. * Contraste estadísticamente significativo (P < 5%) entre tratamientos con y sin peróxido.

En el híbrido resistente la aplicación de H₂O₂ disminuyó el número de lesiones locales, pero aumentó el diámetro de las mismas 15 días después de la inoculación (Fig 4.3, Ver Anexo Tablas 4.3.1 y 4.3.2). Los tests de ELISA realizados a los folíolos inoculados 5 días después de la inoculación y a los apicales no permiten arribar a conclusiones.

C) En el mutante para NADPH oxidasa y el silvestre (Motelle)

En las figuras 4.4 y 4.5 se observa la evolución de síntomas de TSWV y el porcentaje de folíolos ELISA positivos en plantas inoculadas a distintos tiempos luego de la aplicación de estrés térmico con y sin aplicación exógena de H₂O₂, en el silvestre Motelle y el mutante para NADPH oxidasa.

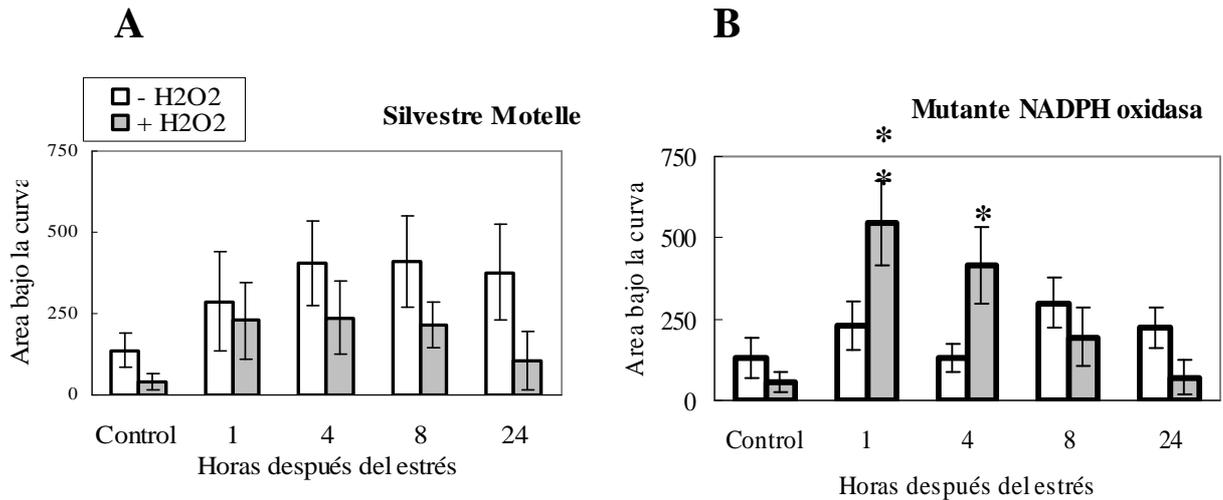


Figura 4.4 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en el silvestre Motelle (A) y en su mutante deficiente en la enzima NADPH oxidasa (B). Variable: área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

* Contraste estadísticamente significativo (P < 5%) entre tratamientos con y sin peróxido. ** Contraste estadísticamente significativo (P < 1%) entre tratamientos con y sin peróxido.

La severidad de los síntomas del mutante no fue mayor a la del silvestre Motelle, éste se comportó de manera similar al híbrido susceptible Bonanza, en cuanto a que incrementó la susceptibilidad por efecto del estrés térmico y la disminuyó con respecto a los tratamientos con H₂O₂ (Fig 4.4, Ver Anexo Tabla 4.4). El mutante alteró su susceptibilidad por efecto de los tratamientos de estrés, respondiendo de igual manera que el híbrido Bonanza, (mostrando síntomas más severos 1 y 4 horas después del estrés) como consecuencia de la aplicación de H₂O₂ (Fig 4.4, Ver Anexo Tabla 4.5).

Como se planteó en la hipótesis de este capítulo, el aumento de predisposición a TSWV causado por las altas temperaturas estaría relacionado con el aumento en liberación de

EAOs, específicamente H_2O_2 y a la activación del sistema antioxidante. El H_2O_2 forma parte de la respuesta de la planta frente a patógenos tanto en interacciones compatibles como incompatibles. Si en el hospedante se activa el sistema antioxidante para preservar sus mecanismos celulares de los daños nocivos ocasionados por las EAOs liberadas frente al estrés abiótico, es posible que este estado redox favorezca además el establecimiento del patógeno al dificultar la liberación de H_2O_2 en el sitio de una infección posterior a dicho estrés. La falta de respuesta del mutante para NADPH oxidasa frente al estrés térmico, si se compara con el silvestre Motelle y el híbrido susceptible Bonanza, podría deberse a que este genotipo, al no poder acumular H_2O_2 en sus tejidos no responde de igual manera que los otros materiales genéticos, pero esta situación se revierte al tratar las plantas con este compuesto.

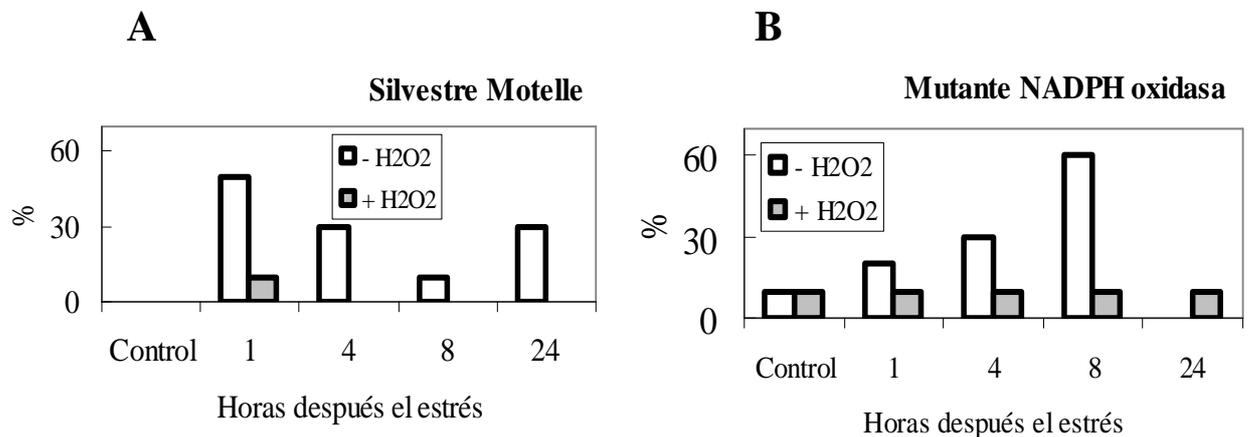


Figura 4.5 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico ($40^{\circ}C$) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Folíolos inoculados ELISA positivos 5 días después de la inoculación en el silvestre Motelle (**A**) y en su mutante deficiente en la enzima NADPH (**B**).

En cuanto al porcentaje de folíolos inoculados ELISA positivos, 5 días después de la inoculación el silvestre presentó mayores valores 1 hora después del estrés, la aplicación de peróxido redujo estos valores. El mutante presentó mayores porcentajes en los tratamientos de estrés pero no siguió el mismo patrón de respuesta que el silvestre, la aplicación de peróxido los redujo en las plantas inoculadas 1, 4 y 8 horas después del estrés, pero no en el control y en las plantas inoculadas 24 horas después del mismo (Fig 4.5).

EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES (SOD Y CAT) EN HOJAS DE CULTIVARES DE TOMATE RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES

En la figura 4.6 se observa la actividad CAT y SOD antes de inocular y después de los tratamientos de estrés en plantas con y sin aplicación de peróxido.

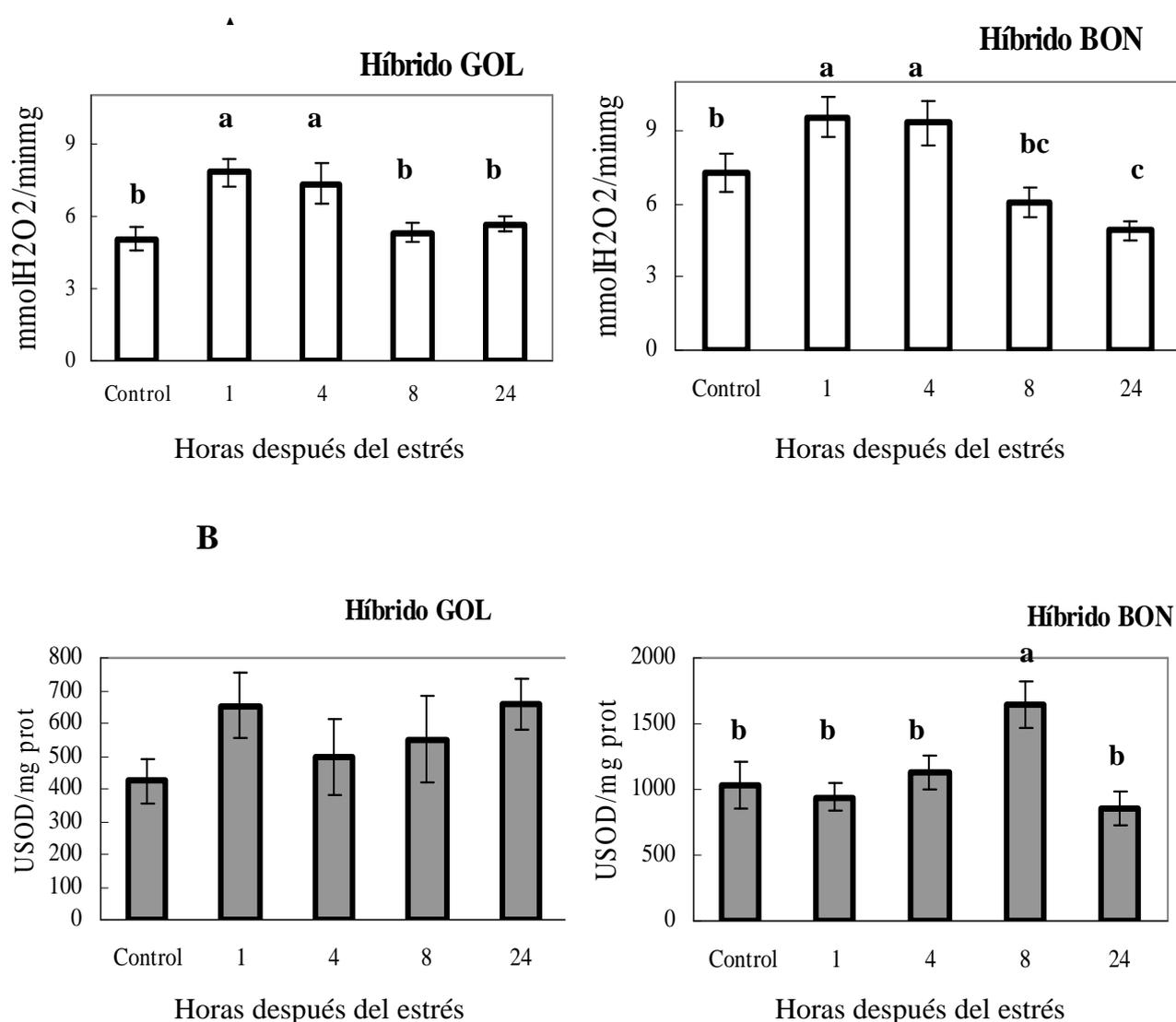


Figura 4.6 Actividad CAT (mmol H₂O₂/min mg prot) (A) y SOD (USOD/mg prot)(B) antes de inocular y después de los tratamientos de estrés. Se muestran medias de una repetición (5 plantas).

Medias con letras iguales no se diferencian significativamente al 5% para el test de comparación de medias múltiples de Duncan.

La actividad CAT aumentó 1 y 4 horas luego de finalizado el estrés en el híbrido susceptible y resistente ($P < 1\%$), estas diferencias fueron significativas para ambos híbridos (Fig. 4.6, Ver Anexo Tabla 4.6). La actividad SOD aumentó significativamente por efecto del estrés en el híbrido susceptible ($P < 5\%$), las diferencias se observaron 8 horas luego de finalizado el estrés. En el híbrido resistente también se observó aumento de la actividad SOD como producto del estrés.

DISCUSION

MODIFICACION DEL EFECTO PREDISONENTE DEL ESTRÉS TERMICO POR APLICACIONES EXOGENAS DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

A) En una interacción planta patógeno compatible

La aplicación de H_2O_2 en el híbrido susceptible, atenuó la severidad de los síntomas sistémicos en todos los tratamientos a excepción de una hora posterior al estrés donde aún persistía el efecto predisponente del mismo, también disminuyó la sistematización del virus, al disminuir el porcentaje de folíolos ELISA positivos 5 días después de la inoculación, salvo en las plantas inoculadas 1 y 4 horas después del estrés. La atenuación de la susceptibilidad que se observó luego de la adición de H_2O_2 , tiene cierta coincidencia con otros trabajos en que se observó aumento en la concentración del mismo en interacciones planta patógeno-compatibles. Por ejemplo, Musetti *et al* (2004), observaron alta concentración de H_2O_2 en hojas de manzano infectadas con APP pero que no evidenciaban síntomas y relacionaron la presencia de peróxido con la imposibilidad del patógeno de multiplicarse y sistematizarse, pero no con la respuesta característica de un gen de resistencia durante la cual se produce explosión oxidativa pero luego el H_2O_2 desaparece rápidamente de los tejidos. Aver'yanov *et al.*, (2008), en las interacciones compatibles arroz-*Magnaporthe grisea* y pepino-*Cladosporium cucumerinum*, observaron que la germinación de las esporas podía contribuir a una gran parte de la producción de anión superóxido y de H_2O_2 y que tanto el patógeno como el hospedante producían EAOs.

Díaz Vivancos *et al.* (2006), encontraron que la infección de PPV produjo incremento de H₂O₂ en el espacio apoplástico de plantas de duraznero y damasco, pero el aumento fue mayor en el cv de damasco susceptible. Li y Burritt (2003), observaron en plantas susceptibles de *Dactylis glomerata* L. que nunca se infectaron con “cocksfoot mottle virus” (CfMV), aumento en los niveles de H₂O₂ junto con la peroxidación de lípidos y avance de síntomas y un leve incremento de H₂O₂, en cambio esto no se observó en plantas totalmente recuperadas de una infección, donde el virus no estaba ya presente y las plantas eran inmunes. En estos casos la presencia de H₂O₂, estaría asociada a una respuesta de la planta y como parte de los síntomas que se expresan frente a una infección viral que no ha sido posible contener. En el mismo sentido Deller *et al.* (2008), encontraron acumulación de H₂O₂ y anión superóxido en hojas infectadas de trigo susceptible a *Mycosphaerella graminicola*, con concentraciones crecientes a medida que aumentaba la severidad de los síntomas y asociado a la presencia de los cuerpos de fructificación del patógeno.

No existen abundantes estudios sobre el rol de las EAOs y el sistema antioxidante en interacciones planta-patógeno compatibles (Stone, 2000; Venisse, 2001; Riedle- Bauer M., 2000); los antecedentes expuestos son difíciles de comparar al tratarse de diferentes patosistemas. Los resultados obtenidos en este trabajo, indicarían que en la alteración causada por el estrés térmico a la interacción establecida entre plantas jóvenes de tomate susceptible y TSWV, el peróxido de hidrógeno tendría un rol al inducir la resistencia basal del genotipo a la infección.

B) En el mutante para NADPH oxidasa y el silvestre (Motelle)

La severidad de los síntomas del mutante no fue mayor a la del silvestre Motelle, éste se comportó de manera similar al híbrido susceptible Bonanza, en cuanto al aumento de predisposición por exposición al estrés térmico, en cambio el mutante para NADPH oxidasa no mostró este patrón de respuesta, pero sí al aplicarse peróxido. En cuanto a la presencia de TSWV en folíolos inoculados, el silvestre presentó mayores porcentajes de folíolos ELISA positivos por acción del estrés, la aplicación de peróxido los redujo. También el mutante presentó mayores porcentajes de folíolos inoculados ELISA positivos

en los tratamientos de estrés, (aunque no siguió el mismo patrón de respuesta que el silvestre), la aplicación de peróxido redujo estos valores (en las plantas inoculadas 1, 4 y 8 horas después del estrés), pero no en el control y en las plantas inoculadas 24 horas después del estrés.

C) En una interacción planta patógeno incompatible

En el híbrido resistente Gol, la aplicación de H₂O₂ disminuyó el número de lesiones locales en el folíolo inoculado pero aumentó el diámetro de las mismas en las plantas inoculadas sin estrés térmico. El aumento en el diámetro de las lesiones por efecto de la aplicación de H₂O₂, fue observado por Li y Burritt (2003) quienes no encontraron una relación directa entre necrosis y resistencia a virus y por otros autores quienes encontraron que la aplicación de EAOs genera necrosis tipo RH que no están asociadas a resistencia frente a la infección viral (Király *et al.*, 2005; Cole *et al.*, 2001; Dat, 2003).

Los resultados obtenidos en los materiales susceptibles, el resistente y el mutante para NADPH oxidasa, indicarían que el H₂O₂ estaría involucrado en el efecto predisponente ocasionado por el estrés térmico. La generación de EAOs es una característica común en interacciones planta-patógeno compatibles e incompatibles (Bolwell, 1998; Bolwell, 2002). En interacciones incompatibles la acumulación de H₂O₂ estaría relacionada a la explosión oxidativa y RH que se desencadena una vez que se produce el reconocimiento del patógeno por parte de los productos del gen de resistencia (Raskin, 1992; Mehdy, 1994; Dangl *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1997; Hoeberichts y Woltering, 2002; De Gara *et al.*, 2003; Lee y Hwang, 2005; Li *et al.*, 2006; Yakimova, 2006; Tománková *et al.*, 2006), en interacciones compatibles podría contribuir a dificultar la multiplicación y dispersión viral en el hospedante (Musetti *et al.*, 2004).

Las EAOs, entre ellas el H₂O₂, tienen el efecto dual de activar la muerte celular programada a altas concentraciones, pero inducir la síntesis de antioxidantes a bajas dosis (Hoeberichts y Woltering, 2002). Estos últimos inhiben la expansión de áreas necróticas, por lo tanto, para que se produzca la RH se deberían suprimir los sistemas de eliminación

de especies activas del oxígeno (De Gara *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.* 1997, 2007). Las plantas sometidas a estrés térmico sufren la liberación de EAOs (Dat *et al.*, 1998; Edreva, 2005; Rizhsky, 2002; Rivero *et al.* 2003), éstos generan daños celulares que deben ser prevenidos, en este período el hospedante tendría bloqueada su capacidad de activar sus sistemas de defensa, debido a la acción incrementada del sistema antioxidante para poder proteger sus células.

Como se expuso anteriormente el H₂O₂ podría contribuir a frenar el establecimiento de patógenos de origen viral en interacciones compatibles (Musetti *et al.*, 2004) Esta podría ser la causa por la cual en el híbrido susceptible y en el silvestre Motelle, el agregado de peróxido atenuó la severidad de los síntomas sistémicos, a excepción de las plantas inoculadas una hora después de finalizado el estrés. En este período los tejidos del hospedante tendrían una mayor actividad antioxidante como respuesta al estrés térmico, lo cual impediría la acumulación de H₂O₂ luego de la infección. Por otra parte en el híbrido resistente el agregado de H₂O₂ redujo el número de lesiones locales en casi todos los tratamientos, aunque originó aumento del diámetro de las mismas.

En la hipótesis de este capítulo se planteó que el aumento de predisposición a TSWV causado por las altas temperaturas estaría relacionado con el aumento en liberación de EAOs, específicamente H₂O₂ y a la activación del sistema antioxidante. Estos cambios ocasionarían una dificultad en el período más cercano a la finalización del estrés térmico por parte del hospedante, de poner en marcha el sistema de defensa, que dependería en parte del H₂O₂ aún en el híbrido susceptible. La falta de respuesta al estrés térmico del mutante deficiente en la enzima generadora de peróxido en el apoplasto y la mayor susceptibilidad generada por la aplicación exógena del mismo, en el período más cercano al estrés térmico, estaría confirmando indirectamente la participación del peróxido de hidrógeno en el efecto predisponente a TSWV del estrés térmico.

El comportamiento del híbrido Bonanza, del silvestre Motelle y del mutante difieren con respecto al híbrido resistente Gol, los tres primeros mostraron una tendencia general a la reducción del número de folíolos inoculados ELISA positivos, por la aplicación de

peróxido mientras que en el híbrido portador del gen de resistencia, la aplicación de peróxido no mostró datos concluyentes.

EFFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS DE ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES (SOD Y CAT) EN HOJAS DE CULTIVARES DE TOMATE RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES

La actividad CAT aumentó 1 y 4 horas luego de finalizado el estrés en el híbrido susceptible y resistente, este aumento de actividad por efecto del estrés térmico fue también en la actividad SOD, pero el aumento fue significativo sólo en el híbrido susceptible, estos resultados obtenidos difieren parcialmente de los obtenidos por Rivero *et al.* (2003), quienes encontraron alta actividad SOD pero baja actividad CAT en plantas sometidas a 35 °C.

De los cambios observados en ambas enzimas, se podría concluir que los períodos de 1 a 4 horas posteriores a la aplicación de estrés térmico, donde se observó un efecto del mismo sobre la predisposición frente a TSWV coincidieron con aumentos en la actividad CAT. En cuanto a la enzima SOD en el híbrido susceptible, también aumentó su actividad como consecuencia del estrés térmico, en el híbrido resistente los datos no permiten arribar a conclusiones, aunque se observa mayor actividad una hora y 8 horas después del estrés.

Esta última observación indicaría que los tratamientos de estrés térmico aplicados lograron modificar el estado redox en las células del hospedante, en coincidencia con aumentos de predisposición frente al patógeno. Los altos niveles de actividad CAT observados en ambos híbridos 1 y 4 hs después del estrés térmico podrían deberse a aumentos en la concentración de peróxido a causa de someter la planta a altas temperaturas.

Las células bajo estrés térmico reaccionan liberando especies activas del oxígeno (Dat *et al.*, 1998) y activando el sistema antioxidante para preservar la maquinaria celular de los efectos nocivos del estrés (Ding *et al.*, 2001; Taiz y Zeiger, 1998; Rizhsky, 2002; Rivero *et al.*, 2003).

Las alteraciones en la expresión del sistema antioxidante, tienen consecuencias sobre la respuesta de la planta a estrés de origen biótico y abiótico, la resistencia de la planta a condiciones de estrés dependerá de su capacidad para adaptar su sistema antioxidante a concentraciones cambiantes de EAOs (Janda, 2005; De Gara et al. 2003). Reducciones en la capacidad antioxidante del hospedante aumentaron la sensibilidad a estrés abiótico (Sanmartín *et al.*, 2003), mientras que la sobreexpresión del mismo aumentó la tolerancia a paraquat, sequía, frío, cadmio, methyl viológeno, *Phytophthora nicotianae*, *Pseudomonas syringae* y *Fusarium spp.* (Edreva, 2005; Yakimova *et al.* 2006; Sarowar *et al.*, 2005; Niggeneg *et al.*, 2004; Lorenc-Kukula *et al.*, 2007); acompañando a estos resultados, recientemente se ha encontrado una relación entre el estado redox de la célula y la regulación de la inducción de RSA por AS (Fobert y Després, 2005; Fobert *et al.*, 2008) y se ha ilustrado cómo el incremento en la actividad de enzimas antioxidantes, modificó la acumulación de H₂O₂ en el sitio de la infección y provocó aumentos en la capacidad de la infección tanto en relaciones planta patógeno incompatibles (Nakajima *et al.*, 2008; Basavaraju *et al.*, 2008) como compatibles (Aver'yanov *et al.*, 2008).

Los resultados de los análisis de la actividad de enzimas antioxidante antes de la inoculación permitirían relacionar la actividad de la enzima catalasa al efecto predisponente del estrés térmico, ya que se obtuvieron mayores valores de actividad en los períodos posteriores al estrés que causaron mayor susceptibilidad a TSWV.

CONCLUSIONES PARCIALES

La aplicación de H_2O_2 en el híbrido susceptible, atenuó la severidad de los síntomas sistémicos y disminuyó la sistematización del virus, al disminuir el número de folíolos inoculados ELISA positivos; este efecto no se observó en plantas inoculadas una hora posterior al estrés térmico donde aún persiste el efecto predisponente del mismo.

En el híbrido resistente Gol, la aplicación de H_2O_2 redujo el número de lesiones locales, pero aumentó el diámetro de las mismas en las plantas mantenidas a 25 °C.

La severidad de los síntomas del mutante no fue mayor a la del silvestre Motelle, éste se comportó de manera similar al híbrido susceptible Bonanza, en cuanto al aumento de predisposición por exposición al estrés térmico, en cambio el mutante para NADPH oxidasa no mostró este patrón de respuesta, pero sí al aplicarse peróxido.

En el híbrido susceptible y resistente se observó antes de la inoculación, mayor actividad de la enzima CAT una y cuatro horas después de finalizado el estrés térmico, coincidiendo con períodos donde se registró un efecto predisponente a TSWV de las altas temperaturas. En cuanto a la enzima SOD, también aumentó su actividad como consecuencia del estrés térmico, en el híbrido susceptible estos cambios fueron estadísticamente significativos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo versa sobre las modificaciones que ejercen altas temperaturas sobre la predisposición del tomate a infecciones por TSWV. Por ende, el primer objetivo de esta tesis fue alterar la expresión de síntomas de TSWV en el hospedante, mediante pretratamientos con altas temperaturas y evaluar los consiguientes cambios en la susceptibilidad sobre el crecimiento y parámetros productivos. Los resultados obtenidos indicaron que el estrés térmico aplicado previo a la inoculación aumentó la predisposición a contraer la virosis en plantas jóvenes de tomate de tres cultivares susceptibles (Bonanza, Moneymaker y Motelle) y uno resistente (Gol) al patógeno.

Se realizaron experimentos para determinar la cantidad de horas necesarias en que se debía mantener al hospedante a 40 °C, para lograr un aumento de predisposición al patógeno. En el híbrido susceptible Bonanza, la mayor predisposición se observó a partir de 1 hora de aplicación del estrés, este efecto se manifestó como aumento en la severidad de síntomas sistémicos a los 5 días de la inoculación y mayores valores de área bajo la curva de la enfermedad. Esta última variable, integra los valores de severidad observados durante el período de evaluación posterior a la inoculación y permite analizar los efectos de los tratamientos sobre el progreso de la enfermedad.

En el híbrido resistente Gol el efecto predisponente del estrés térmico, se observó a partir de 4 horas de aplicado el mismo. Esto se evidenció como mayor número y diámetro de lesiones locales, así como mayor concentración viral en el folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación. No se observaron síntomas sistémicos en ninguno de los experimentos desarrollados con este híbrido. Las lesiones locales observadas se interpretaron como áreas de tejido necrosadas por acción del gen de resistencia ante la infección viral.

También se determinó la duración del efecto de predisposición causado por el estrés térmico (24 horas a 40 °C) (Fig 1, A y B). En el híbrido susceptible, las plantas inoculadas hasta 4 horas después de finalizado el estrés manifestaron síntomas sistémicos más

severos. En el híbrido resistente la duración del efecto del estrés fue de una hora, este efecto se basó en un mayor número y diámetro de las lesiones locales.

Los datos obtenidos coinciden con estudios realizados por otros investigadores e indican que el estrés térmico afectó la respuesta temprana de la planta luego de la inoculación con TSWV y esto se manifestó luego en el progreso de la enfermedad, ya sea en el aumento de la severidad de síntomas sistémicos en coincidencia con Brakke y Samson, (1981), Llamas-Llamas *et al.* (1998) y Díaz Perez, (2007) o en el mayor desarrollo de lesiones necróticas, resultados similares a los obtenidos por Best, (1936), Kassanis, (1952), Gonzalez y Pound, (1963), Pound y Walker, (1945), Pound y Weather, (1953), Helms y Mc Intyre, (1964), Yarwood, (1958), Wu *et al.*, (1969), Tu, (1989) y Zheng, (2005). El mayor número y diámetro de las lesiones locales que se observaron en el híbrido resistente Gol, así como la detección del patógeno a través del test de ELISA, serían producto de un atraso en la capacidad del tejido del hospedante de manifestar estas reacciones de resistencia, capacidad que se habría restablecido posteriormente, ya que no se observaron síntomas sistémicos como resultado de los tratamientos aplicados. Por el contrario, otros investigadores, en otro tipo de interacciones planta patógeno, sí los observaron como resultado de la aplicación de estrés térmico reemplazando a reacciones localizadas (Samuel, 1931; Hutton y Peak, 1952; Yarwood, 1958; Raskin, 1992; Valkonen y Watanabe, 1999 y Moury *et al.*, 1998).

El aumento en la infección provocada por la aplicación de estrés térmico al hospedante antes de la misma, ha sido observada en numerosas interacciones planta patógeno que involucran a virus (Yarwood, 1976). Si bien ninguno de los antecedentes mencionados puede utilizarse en comparación directa con el estudio presentado en esta tesis, ya que los tratamientos no se realizaron con la misma metodología o rango de temperaturas, se podría concluir que el efecto del estrés térmico aplicado antes de la inoculación sobre la infección viral en interacciones compatibles e incompatibles depende de cada interacción planta-patógeno y que cuando esta interacción involucra a tomate y TSWV el aumento en la temperatura favorece la infección viral y el establecimiento del patógeno en los tejidos inoculados. Esto se traduciría en una mayor severidad de síntomas sistémicos si el hospedante es susceptible y un atraso en la expresión del gen de resistencia manifestado a

través de un mayor número y tamaño de lesiones locales cuando el hospedante es portador del gen de resistencia Sw5.

Los autores de los trabajos más antiguos que describen el efecto del estrés térmico en distintas interacciones virus-hospedante atribuyeron sus resultados a cambios fisiológicos ocasionados por el estrés térmico como la reducción de carbohidratos (Kassanis, 1952; Bawden y Roberts, 1947, 1948; Wiltshire, 1956), el aumento en el poder de invasión del virus (Yarwood, 1958), el retraso en el inicio de la reacción hipersensible y la consecuente muerte de células infectadas y disminución de la tasa de deposición de calosa (Wu *et al.*, 1969), y a modificaciones en la capacidad diferencial para soportar el inicio y desarrollo de una infección viral (Helms y Mc Intyre, 1964). En la década del 90 se describió la inestabilidad de algunos genes de resistencia a altas temperaturas para algunos virus incluido TSWV (Valkonen y Watanabe, 1999; Moury *et al.*, 1998) y la pérdida de capacidad de desarrollar la reacción en plantas sometidas a estrés térmico, fue asociada a una baja acumulación de ácido salicílico (AS) (Raskin, 1992).

En los últimos años se han realizado importantes aportes al conocimiento de los procesos fisiológicos que modulan la infección viral y a la relación entre el estrés térmico y el aumento de predisposición del hospedante. Algunos de estos avances involucran a las proteínas de choque térmico, éstas juegan un rol primordial en mantener la estructura proteica luego de someter a las células a altas temperaturas pero además, la expresión de algunas de ellas como las Hsp70 es inducida por un amplio rango de virus incluyendo miembros de los géneros Potyvirus, Tobravirus, Potexvirus, Geminivirus y Cucumovirus (Aranda *et al.*, 1996; Whitham *et al.*, 2003; Aparicio *et al.*, 2005) y su acumulación ha sido observada en distintos patosistemas donde participan patógenos de origen viral (Havelda y Maule, 2000). Estas proteínas podrían servir de chaperonas a los virus para cumplir con algunas funciones como la replicación viral y el movimiento célula a célula (Agarwal *et al.*, 2002; Soellick *et al.*, 2000; von Bargen, 2001; Schereier, 2001; Gallie *et al.*, 2002), tal es así que se las ha encontrado asociadas a los plasmodesmos (Aoki *et al.*, 2002). Otra vía por la cual estas proteínas podrían influir en la susceptibilidad a virus sería inhibiendo la muerte celular programada, que forma parte de la respuesta al patógeno en interacciones incompatibles (Buzzard *et al.*, 1997; Beer y Green, 2001; Shan *et al.*, 2003; Le Blanc, 2003; Pandey *et al.*, 2000).

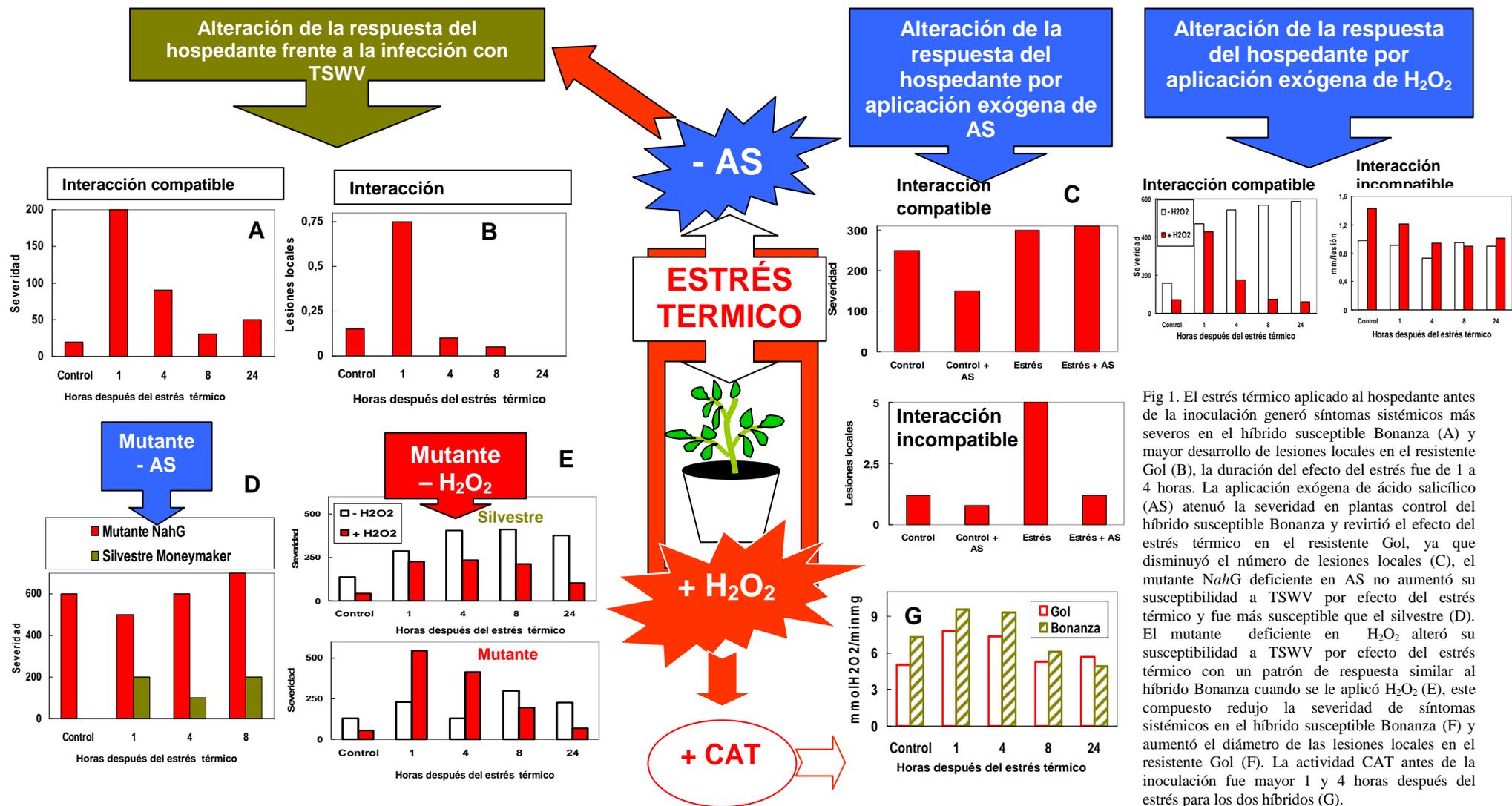


Fig 1. El estrés térmico aplicado al hospedante antes de la inoculación generó síntomas sistémicos más severos en el híbrido susceptible Bonanza (A) y mayor desarrollo de lesiones locales en el resistente Gol (B), la duración del efecto del estrés fue de 1 a 4 horas. La aplicación exógena de ácido salicílico (AS) atenuó la severidad en plantas control del híbrido susceptible Bonanza y revirtió el efecto del estrés térmico en el resistente Gol, ya que disminuyó el número de lesiones locales (C), el mutante *NahG* deficiente en AS no aumentó su susceptibilidad a TSWV por efecto del estrés térmico y fue más susceptible que el silvestre (D). El mutante deficiente en H₂O₂ alteró su susceptibilidad a TSWV por efecto del estrés térmico con un patrón de respuesta similar al híbrido Bonanza cuando se le aplicó H₂O₂ (E), este compuesto redujo la severidad de síntomas sistémicos en el híbrido susceptible Bonanza (F) y aumentó el diámetro de las lesiones locales en el resistente Gol (F). La actividad CAT antes de la inoculación fue mayor 1 y 4 horas después del estrés para los dos híbridos (G).

Otra alteración de los procesos celulares que se identifican como producto del estrés térmico y podría afectar la respuesta de la planta frente a la infección viral es la liberación de EAOs (Dat *et al.*, 1998; Edreva, 2005; Rizhsky, 2002 y Rivero *et al.* 2003), éstas generan daños celulares y el aumento en la actividad de enzimas antioxidantes que actúan para prevenirlos; algunas de estas enzimas son inducidas por los mismos virus en el sitio de la infección (Escaler *et al.*, 2000; Maule *et al.*, 2002; Riedle-Bauer, 2000; Li y Burritt, 2003; Díaz Vivancos *et al.*, 2006).

En cuanto al AS y su relación con el estrés térmico, Canto y Palukaitis (2002), aportaron más evidencias sobre el rol de este compuesto en el aumento de susceptibilidad a enfermedades causado por altas temperaturas, ya que encontraron que el gen N de tabaco que otorga resistencia a TMV por debajo de los 28°C, confiere también resistencia al virus mutante TMV-GFP que expresa una proteína verde fluorescente. Esta resistencia es termo independiente y experimentos con plantas *NahG*, deficientes en AS demostraron que opera a través de una vía independiente del mismo. Teniendo en cuenta la conexión existente entre el AS y el aumento de susceptibilidad por estrés térmico en una etapa posterior de esta tesis, se intentó describir los efectos de aplicaciones exógenas de AS sobre la susceptibilidad frente a la infección por TSWV, en plantas provenientes de tratamientos de estrés térmico de cultivares de tomate resistentes y susceptibles y en genotipos deficientes en la producción de AS.

Los resultados obtenidos indican que el AS está involucrado en la predisposición del cultivo de tomate a esta enfermedad y coinciden en términos generales con los antecedentes citados por otros autores sobre el rol que cumple el AS en la respuesta frente a patógenos de tipo viral (White *et al.*, 1983; Malamy *et al.*, 1990; Raskin, 1992; Gaffney *et al.*, 1993; Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Chivasa *et al.*, 1997; Thulke y Conrath, 1998; Murphy *et al.*, 1999; Jeun *et al.*, 2000; Galis *et al.*, 2004; Silverman *et al.*, 2005; Murphy y Carr, 2002). En el híbrido susceptible (Fig 1, C) la vinculación de este efecto con el aumento de susceptibilidad ocasionado por el estrés térmico, no quedó determinada con claridad como resultado de estos ensayos, ya que sólo se observó en plantas no estresadas una atenuación de síntomas sistémicos y disminución de la sistematización del

virus (aunque sí se observó en las evaluaciones de parámetros productivos, disminución en el descarte de frutos virósicos en plantas inoculadas luego del estrés).

En el híbrido resistente el AS atenuó el aumento en el número y tamaño de lesiones locales y disminuyó la sistematización del virus, ambos efectos ocasionados por el estrés térmico (Fig 1, C), en coincidencia con los obtenidos por White (1979) y Yalpani *et al.* (1991) y podrían explicarse considerando que en interacciones hospedante-patógeno incompatibles, la reacción hipersensible es un evento muy importante para el inicio de la expresión de las reacciones de defensa (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Según Mur *et al.*, (1997), la alteración de la acumulación de AS en la explosión oxidativa inicial aumentaría la dispersión viral y retrasaría la muerte de tejidos durante el establecimiento de la lesión. Esto podría ser la causa del mayor número de lesiones locales y diámetro de las mismas, que se observó en las plantas del híbrido portador del gen de resistencia Sw5 cuando fueron inoculadas luego de los tratamientos de estrés térmico. Las observaciones coinciden con el trabajo de Canto y Palukaitis (2002), para quienes las alteraciones en el patrón de expresión de los productos de un gen de resistencia comprometen el número y tamaño de las lesiones necróticas locales y el eventual establecimiento de la resistencia sistémica adquirida. El hecho de que la aplicación de AS al híbrido portador del gen Sw5 atenuara este efecto, podría demostrar que existe una conexión entre las dificultades en su acumulación en los tejidos ocasionadas por las altas temperaturas y las causas del efecto de predisposición a TSWV causado por estrés térmico en el híbrido resistente.

Para poder inferir la intervención del AS en los cambios de predisposición frente a TSWV ocasionados por el estrés térmico, se estudió la respuesta de un material mutante portador del gen *NahG*, que lo hace deficiente en ácido salicílico, comparado con su silvestre Moneymaker. El mutante *NahG* registró mayores valores de área bajo la curva de progreso de la enfermedad con respecto al silvestre (Fig. 1 D), pero no aumentó su susceptibilidad a causa de los tratamientos de estrés, la aplicación de AS atenuó en este material síntomas en las plantas control y una hora después del estrés. Estos resultados coinciden con los de Zhang (2004) y Alamillo *et al.* (2006) quienes estudiaron el comportamiento de mutantes *NahG* frente a patógenos en interacciones compatibles.

El silvestre Moneymaker se comportó de manera similar al híbrido susceptible Bonanza en cuanto a que mostró mayor susceptibilidad a la infección por la aplicación de estrés térmico (Fig. 1 D), el AS redujo el porcentaje de folíolos inoculados y apicales ELISA positivos 5 días después de la inoculación. Esta respuesta fue aleatoria en el mutante *NahG* que degrada el AS en catecol. La falta de respuesta al estrés térmico del mutante deficiente en AS apoyaría la hipótesis de que la predisposición a TSWV en tomate causada por estrés térmico, está relacionada con la imposibilidad de acumular AS. Reforzando esta idea se observó menor replicación y sistematización del virus en el silvestre Moneymaker como resultado de la aplicación de AS, en cambio esta respuesta fue aleatoria en el mutante *NahG*, aunque se observó atenuación de síntomas en las plantas control.

Las dificultades en acumular ácido salicílico que presenta la célula expuesta a altas temperaturas (Raskin, 1992), la privaría de un componente esencial en el normal inicio de los mecanismos de defensa frente al ataque de un patógeno. La relación entre el efecto predisponente del estrés térmico y el AS se observó en el híbrido resistente y no en el susceptible debido posiblemente a que el primero es portador de un gen de resistencia responsable de desencadenar esta respuesta de defensa y por ende se vería más influenciado a los cambios generados en el contenido endógeno de AS, ya sea por efecto de la aplicación de altas temperaturas como por su aplicación exógena. En el híbrido susceptible el efecto predisponente del estrés térmico se vería explicado además por otros cambios sufridos por el hospedante, como podría ser alteraciones en la liberación de H₂O₂ y la modulación del sistema antioxidante.

Según Huang *et al.*, 2005 en hospedantes susceptibles, los virus que infectan a las plantas inducen la expresión de un conjunto común de genes la mayoría de los cuales están inducidos por AS. La expresión de muchos de estos genes podría compartir componentes de señales involucradas en interacciones incompatibles, pero su expresión incrementada no tendría efectos sobre la expresión viral. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis demostrarían que en interacciones planta patógeno compatibles específicamente tomate y TSWV, el AS estaría involucrado en la respuesta a la infección por vías independientes a

las que inducen RH. El AS podría también inducir reacciones de respuesta frente a la infección por virus en plantas que no tienen un gen de resistencia, esto ocurriría en ausencia de muerte celular y se traduciría en reducción de la cantidad de virus en el tejido infectado y retraso en la aparición de síntomas (White *et al.*, 1983; Chivasa *et al.*, 1997).

Se intentó verificar si los mecanismos de defensa ante la infección viral, en plantas sometidas a estrés térmico, dependen de la capacidad de liberar especies activas de oxígeno (EAOs), específicamente H_2O_2 . Ya que no se contó con la posibilidad de medir directamente la concentración de H_2O_2 en los tejidos se realizaron algunos experimentos en los cuales éste fue aplicado exógenamente y se utilizó un material deficiente en la liberación de H_2O_2 , mutante para la enzima NADPH oxidasa, responsable de la liberación de ión superóxido y consecuentemente peróxido, al apoplasto.

La aplicación de H_2O_2 en el híbrido susceptible atenuó la severidad de los síntomas sistémicos (Fig. 1 F) y disminuyó la sistematización del virus, al disminuir el número de folíolos inoculados y apicales ELISA positivos. En relación a estos resultados, aumentos en la concentración de H_2O_2 fueron observados por otros autores en hospedantes susceptibles en infecciones virales atenuadas (Musetti *et al.*, 2004) o severas (Li y Burritt, 2003; Díaz Vivancos *et al.*, 2006)

El silvestre Motelle alteró su susceptibilidad a TSWV como consecuencia del estrés térmico aplicado antes de la inoculación con el mismo patrón de respuesta que el híbrido Bonanza; pero el mutante para NADPH oxidasa sólo mostró síntomas más severos al inocularse de 1 a 4 horas después estrés térmico, cuando se aplicó H_2O_2 (Fig 1. E). En cuanto a la presencia de TSWV en los folíolos inoculados el silvestre presentó mayores porcentajes de folíolos ELISA positivos en plantas inoculadas 1 hora después de aplicado el estrés y la aplicación de peróxido redujo estos valores. El mutante presentó mayores porcentajes de folíolos ELISA positivos en los tratamientos de estrés, aunque no siguió el mismo patrón de respuesta que el silvestre, la aplicación de peróxido redujo estos valores (en las plantas inoculadas 1, 4 y 8 horas después del estrés), pero no en el control y en las plantas inoculadas 24 horas después del estrés. Como se planteó en la hipótesis de esta tesis, el aumento de predisposición a TSWV causado por las altas temperaturas estaría

relacionado con el aumento en liberación de EAOs, específicamente H_2O_2 y a la activación del sistema antioxidante. Estos cambios modificarían la capacidad del hospedante de generar una respuesta frente a la infección, la cual depende en parte del H_2O_2 aún en el híbrido susceptible y explicaría la diferencia en el patrón respuesta del mutante para NADPHA oxidasa frente al estrés térmico sin la aplicación de H_2O_2 , situación que se revirtió al tratar las plantas del mutante con este compuesto.

En el híbrido resistente la aplicación de H_2O_2 redujo el número de las lesiones locales pero aumentó el diámetro de las mismas (Fig. 1 F), esto pudo deberse a la inducción de necrosis en el tejido ocasionada por el H_2O_2 , pero no relacionada a RH (Dat, 2003). Este resultado coincide con los resultados de otros autores, quienes no encontraron una relación directa entre necrosis y resistencia a virus (Li y Burritt, 2003) y observaron que la concentración de TMV en plantas resistentes era menor infectadas a 20 °C que a 30 °C, a pesar de que se observaran lesiones necróticas tipo RH luego de la aplicación de generadores de EAOs, incluido el H_2O_2 (Király *et al.*, 2005). Estos datos también coinciden con los obtenidos en las primeras etapas de este trabajo, en cuanto a que el mayor desarrollo de lesiones locales en los folíolos inoculados luego del estrés térmico, se relacionó con la pérdida de la capacidad del hospedante de frenar el desarrollo de la infección a causa de los tratamientos de estrés. Király *et al.* (2005), refuerzan esta observación, ya que según ellos la resistencia a virus podría ser independiente de la necrosis de tejido inducida por el patógeno, pero no de la temperatura.

Los resultados obtenidos en los materiales resistente y susceptibles (aunque no exista explosión oxidativa en estos últimos), indicarían que el H_2O_2 estaría involucrado en el efecto predisponente ocasionado por el estrés térmico. La generación de EAOs es una característica común en interacciones planta-patógeno compatibles e incompatibles (Bolwell, 1998; Bolwell, 2002). En interacciones incompatibles la acumulación de H_2O_2 estaría relacionada a la explosión oxidativa y RH que se desencadena una vez que se produce el reconocimiento del patógeno por parte del gen de resistencia (Raskin, 1992; Mehdy, 1994; Dangl *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1997; Hoeberichts y Woltering, 2002; De Gara *et al.* 2003; Lee y Hwang, 2005; Li *et al.*, 2006; Yakimova *et al.*, 2006 y Tománková *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2008; Basavaraju *et al.*, 2008). En interacciones compatibles

podría contribuir a dificultar la multiplicación y dispersión viral en el hospedante (Musetti *et al.*, 2004) o frenar la infección de patógenos de distinta etiología (Aver'yanov *et al.*, 2008).

Las EAOs entre ellas el H_2O_2 , tienen el efecto dual de activar la muerte celular programada a altas concentraciones, pero inducir la síntesis de antioxidantes a bajas dosis (Hoeberichts y Woltering, 2002), éstos inhiben la expansión de áreas necróticas, por ende, para que se produzca la RH se deberían suprimir los sistemas de eliminación de especies activas del oxígeno (De Gara *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.* 1997, 2007). Estas últimas se liberan en las células de las plantas sometidas a estrés térmico (Dat *et al.*, 1998; Edreva, 2005; Rizhsky, 2002; Rivero *et al.* 2003) y generan daños celulares que deben ser prevenidos mediante la actividad de enzimas antioxidantes, por lo tanto, en este período el hospedante tendría limitada su capacidad de activar sus sistemas de defensa, debido a la acción incrementada del sistema antioxidante. Esta hipótesis fue verificada en la última etapa del trabajo, evaluando los efectos de los tratamientos sobre las actividades de las enzimas antioxidantes SOD y CAT. Los períodos de 1 a 4 horas posteriores a la aplicación de estrés térmico, donde se observó un efecto del mismo sobre la predisposición frente a TSWV coincidieron con aumentos en la actividad CAT (Fig 1 G). En cuanto a la enzima SOD también aumentó su actividad como consecuencia del estrés térmico, pero el patrón de respuesta fue diferente. Los resultados obtenidos difieren parcialmente de los obtenidos por Rivero *et al* (2001), quienes encontraron alta actividad SOD pero baja actividad CAT en plantas sometidas a 35 °C.

Los tratamientos de estrés térmico aplicados antes de la inoculación, habrían modificado el estado redox en las células del hospedante, en coincidencia con aumentos de predisposición frente al patógeno. Los mayores niveles de actividad CAT observados en ambos híbridos 1 y 4 hs después del estrés térmico podrían deberse a aumentos en la concentración de H_2O_2 a causa de someter la planta a altas temperaturas. Este resultado concuerda con el hecho de que en ese período no se observó un efecto benéfico de la adición de H_2O_2 en el híbrido susceptible Bonanza.

Como se explicó en los puntos anteriores, la protección de la maquinaria celular de los efectos deletéreos del estrés térmico tendría prioridad sobre la defensa contra patógenos (Snyman y Cronjé, 2008). La explosión oxidativa donde intervienen las especies activas del oxígeno y el AS, podría verse postergada ante la necesidad de liberar enzimas antioxidantes y evitar la acumulación de compuestos citotóxicos. Este cuadro llevaría al retraso en la puesta en marcha de los mecanismos de defensa frente a patógenos hasta que se hayan superado las limitantes impuestas por las altas temperaturas. Esta podría ser la causa por la cual en el híbrido susceptible y en el silvestre Motelle, el agregado de peróxido atenuó la severidad de los síntomas sistémicos, a excepción de las plantas inoculadas una hora después de finalizado el estrés. El comportamiento del mutante que tiene disminuida su capacidad para generar H_2O_2 verificaría esta hipótesis, ya que modificó su susceptibilidad por aplicación de estrés térmico de manera diferente al híbrido Bonanza y el silvestre Motelle, pero el agregado de H_2O_2 revirtió estas diferencias.

El comportamiento del híbrido Bonanza, del silvestre Motelle y del mutante difieren con respecto al híbrido resistente Gol, los tres primeros mostraron una tendencia general a la reducción del número de folíolos inoculados ELISA positivos, por la aplicación de peróxido mientras que en el híbrido portador del gen de resistencia, la aplicación de peróxido no mostró datos que permitan sacar conclusiones. La presencia del gen de resistencia modificaría la respuesta del hospedante ante la aplicación de H_2O_2 ya que la posibilidad de frenar la infección del patógeno, dependería de la posibilidad de generar una rápida respuesta en el sitio de la infección. El incremento en la actividad de enzimas antioxidantes en el período donde aún perdura el efecto del estrés térmico, podría verse incrementado por el agregado de peróxido de hidrógeno antes de la inoculación, retardando el inicio de la respuesta que depende de la posibilidad de generar una explosión oxidativa en el sitio de la infección. El mayor desarrollo de las lesiones locales en los tratamientos con peróxido son un indicio de que la aplicación de este compuesto, podría haber generado en el hospedante la activación del sistema antioxidante. La respuesta diferente al estrés térmico del mutante deficiente en la enzima generadora de peróxido en el apoplasto y la mayor susceptibilidad generada por la aplicación exógena del mismo, en el período en que el silvestre sufrió el efecto predisponente del estrés térmico, estaría verificando

indirectamente la participación del H_2O_2 de hidrógeno en el efecto predisponente a TSWV del estrés térmico.

Existe una relación entre los resultados obtenidos en los experimentos en que se investigó la aplicación exógena de AS y la de H_2O_2 . La aplicación de ácido salicílico no revirtió los efectos del estrés térmico en el híbrido susceptible Bonanza, ni en el cv Moneymaker, esto sugiere que la inducción de mecanismos de defensa basal frente a la infección viral en el material susceptible, no se restituye con la simple adición de AS, debido a que el metabolismo del hospedante podría estar aún bajo los efectos del estrés oxidativo causado por las altas temperaturas. En la primera etapa de la tesis se demostró que el efecto predisponente a TSWV del estrés térmico perdura hasta 4 horas después de la aplicación del mismo. Los resultados obtenidos con la aplicación de peróxido coinciden con esta observación ya que tanto en el híbrido susceptible Bonanza como en el cv Motelle, la adición de peróxido atenuó los síntomas sistémicos de la enfermedad, salvo en el período una hora después del estrés térmico. El mutante para la enzima NADPH oxidasa respondió al estrés térmico aumentando la susceptibilidad cuando se agregó peróxido en el período 1 y 4 horas después del estrés. Por lo tanto se podría concluir que el ácido salicílico en el material susceptible no puede promover mecanismos de defensa cuando aún está la célula bajo los efectos del estrés oxidativo.

La respuesta observada en el material resistente varió de lo analizado en párrafos anteriores, en este caso se observó que la aplicación de AS sí revirtió los efectos del estrés térmico en cambio la adición de H_2O_2 aumentó el diámetro de lesiones locales. En la primera etapa de la tesis se determinó que el efecto del estrés térmico en el material resistente perduró hasta una hora después del estrés, es decir que pasado ese período los productos del gen de resistencia estarían en condiciones de reconocer al patógeno y desencadenar la respuesta hipersensible. Eso podría explicar el efecto benéfico del AS al estar presente en la célula una vez que ya se atenuó el efecto negativo del estrés térmico. El mayor desarrollo de las lesiones locales ocasionadas por el peróxido estaría reforzando el concepto de que el mayor diámetro de las mismas en plantas estresadas indica menor capacidad de respuesta frente al patógeno en el momento de la inoculación debido al estrés oxidativo ocasionado por las altas temperaturas. Las diferencias en la respuesta de los dos

tipos de interacciones compatibles e incompatibles podría radicar en la presencia del gen de resistencia, cuya capacidad de reconocimiento del patógeno y contención del avance de la infección se restableció una hora después de finalizado el estrés.

Las dificultades en acumular AS a altas temperaturas podría ser una de las causas del aumento de susceptibilidad a TSWV, según lo indicarían la falta de respuesta frente al estrés del mutante *NahG* y la disminución de frutos con síntomas de virosis observada en plantas estresadas e inoculadas, pero su adición no logró revertir el efecto del estrés térmico, en el híbrido Bonanza ni en el silvestre Monymaker, por lo que se podría concluir que la capacidad de inducir la resistencia basal a altas temperaturas es alterada además por otros mecanismos, que podrían estar relacionados a la acumulación de H₂O₂ y expresión de enzimas antioxidante. La deficiencia de estas últimas también podrían explicar la falta de respuesta frente al estrés del mutante para el gen *NahG*, ya que el AS está involucrado en su inducción. En cambio, en el híbrido resistente, la adición de AS logró revertir el efecto negativo del estrés térmico sobre la expresión del gen *Sw5*, y la acumulación de este compuesto en los tejidos afectados por las altas temperaturas podría haber ayudado a recuperar la capacidad de inducir mecanismos de resistencia.

El efecto de la aplicación de AS sobre parámetros productivos, en los experimentos conducidos en condiciones controladas fueron aumentos de rendimiento total en las plantas del híbrido susceptible inoculadas, pero no sometidas a estrés y menores descartes por virósico en plantas estresadas y control. También se observaron aumentos de rendimiento en las plantas inoculadas en el híbrido resistente y aumentos de rendimiento comercial en plantas sanas de ambos híbridos.

En condiciones de inóculo natural, los tratamientos con AS redujeron el porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra” en el híbrido susceptible en las 4 campañas ensayadas, sin observarse síntomas de fitotoxicidad ni aumento en la predisposición de otras enfermedades o plagas. Estos resultados coinciden con los de Tally *et al.*, (1999) quienes redujeron la incidencia de plantas de tomate con síntomas de TSWV asperjadas con ABM pero observaron además una reducción del número de frutos en relación directa a la cantidad aplicada de este activador. Por el contrario, en esta tesis las consecuencias de

la aplicación de ácido salicílico sobre parámetros de rendimiento fueron positivas en el cultivar susceptible y en el resistente, tanto en plantas inoculadas como en las sometidas a inóculo natural. Este efecto benéfico del AS tanto en el híbrido susceptible como en el resistente podría deberse a la acción de defensa generada en el cultivo por este inductor sobre otros patógenos distintos a TSWV o efectos fisiológicos vinculados al estrés del transplante u otro tipo de condiciones subóptimas de origen abiótico como el estrés térmico (Borsani *et al.*, 2001; Dat *et al.*, 1998 a y b; Dat *et al.*, 2000; Janda *et al.*, 1999; Wang y Li, 2005; Senaratna *et al.*, 2000; Szepesi *et al.*, 2005). Eso indicarían los resultados obtenidos en las plantas asperjadas con ácido salicílico y que recibieron el efecto del estrés térmico antes del transplante, las que mostraron mayor rendimiento total y comercial tanto en el híbrido susceptible como en el resistente.

Existen antecedentes sobre el efecto de activadores de resistencia como el acibenzolar metil (ABM) (Ruess, 1998; Tally *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2001; Louws *et al.*, 2001; Chinnasri *et al.*, 2006; Piris *et al.*, 2007). El uso de estos compuestos podría ser cuestionado si se considera que en algunos casos podría ocasionar fitotoxicidad o reducciones en el rendimiento, o representar una tecnología demasiado costosa, pero podrían ser de utilidad en cultivos bajo cubierta donde es más sencillo monitorear y modificar determinadas variables ambientales (temperatura, humedad relativa) y donde podrían combinarse con el uso de biocontroladores en el marco de un manejo integrado de plagas y enfermedades (Lyon y Newton, 2000; Staub 2001; USDA, 2003; Hoover, 2004).

Si bien en este trabajo no se observaron síntomas sistémicos en el híbrido de tomate portador del gen Sw5 como efecto de la aplicación de estrés térmico, sí se observó que la aplicación de AS a plantas estresadas logró revertir los efectos de las altas temperaturas en cuanto a reducir el número y tamaño de las lesiones locales, la concentración viral y sistematización del patógeno. Considerando los trabajos de Moury *et al.* (1998), quienes observaron que la resistencia a TSWV conferida por el gen Tsw en pimiento es menos estable a 32 °C que a 22 °C y de Soler *et al.* (1998) quienes registraron una mayor susceptibilidad a regímenes de 30/18 °C (día/noche) que 25/18 °C, en poblaciones de *Capsicum chinense*, resistentes a TSWV; estos antecedentes nos permitirían especular sobre el posible uso que podrían tener los activadores de resistencia si se hallaran

momentos óptimos en que pudieran aplicarse para mejorar la expresión de genes de resistencia con dificultades para manifestar su efecto a altas temperaturas y de esa manera evitar la aparición de quiebres de la resistencia. Este fenómeno se observa últimamente en distintos países productores de hortalizas incluido nuestro país, (Picó, 2002; Roggero *et al.*, 2002; Margaria, 2004; Calvo *et al.*, 2008) y en el transcurso de esta tesis, es importante el aumento de plantas con síntomas sistémicos a lo largo de las campañas teniendo en cuenta además evaluaciones realizadas. Los resultados de los test de ELISA indican que esto se debería a que las cepas del patógeno que vencen el gen de resistencia son mutaciones de TSWV o genotipos ya existentes que han aumentado su frecuencia poblacional ante la presión de selección ejercida por el uso de la misma fuente de resistencia en los híbridos comerciales de tomate resistentes a “peste negra” que se utilizan actualmente.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a determinar, cual es la etapa del cultivo de tomate en que el activador podría ser utilizado como parte del manejo integrado de TSWV, sin ocasionar efectos no deseados sobre parámetros de crecimiento y producción, ni aumentar la susceptibilidad a otras enfermedades o plagas que pudiera estar regulada por mecanismos que la vía del salicílico pudiera influir negativamente. Se propone una ventana de oportunidad para la aplicación de AS, la misma comprendería la etapa desde el transplante hasta 45 días después del mismo en que este compuesto podría aplicarse para reducir la incidencia de virosis, obteniéndose aumentos en el rendimiento y sin resultados negativos sobre otros problemas sanitarios que pudieran afectar al cultivo.

CONCLUSIONES GENERALES

El estrés térmico aplicado previo a la inoculación aumentó la predisposición a contraer TSWV en plantas jóvenes de tomate de tres cultivares susceptibles (Bonanza, Moneymaker y Motelle) y uno resistente (Gol) al patógeno.

El ácido salicílico está involucrado en la resistencia del cultivo de tomate a esta enfermedad de origen viral. En el híbrido susceptible la vinculación de este efecto con el ocasionado por el estrés térmico, no queda clara como resultado de estos ensayos. En el híbrido resistente el AS atenuó el aumento en el número y tamaño de lesiones locales y disminuyó la sistematización del virus, ambos efectos ocasionados por el estrés térmico. En condiciones de inóculo natural, los tratamientos con ácido salicílico redujeron el porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra” en el híbrido susceptible Bonanza. La aplicación de AS tuvo efectos benéficos en el rendimiento de plantas susceptibles y resistentes a TSWV transplantadas antes de estar sometidas a estrés térmico.

El H_2O_2 es otro compuesto vinculado al efecto predisponente del estrés térmico. La aplicación del mismo en el híbrido susceptible, atenuó la severidad de los síntomas sistémicos y disminuyó la sistematización del virus, al disminuir el número de folíolos inoculados ELISA positivos; este efecto no se observó en plantas inoculadas una hora posterior al estrés térmico donde aún persiste el efecto predisponente del mismo. En este período se observó en el híbrido resistente y el susceptible antes de la inoculación, mayor actividad de la enzima CAT una y cuatro horas después de finalizado el estrés térmico. Asimismo, la enzima SOD aumentó su actividad como consecuencia del estrés térmico, en el híbrido susceptible.

RECOMENDACIONES

Las prácticas culturales que impliquen someter a las plantas a estrés térmico debido a mal dimensionamiento de los invernaderos o fallas en la ventilación tendrán efectos negativos sobre la susceptibilidad de plantas jóvenes de tomate a TSWV.

Aplicaciones exógenas de ácido salicílico a la dosis ensayada, los primeros 45 días después del trasplante tendrán un efecto benéfico al disminuir la incidencia de esta enfermedad y sobre parámetros de rendimiento tanto en materiales susceptibles como resistentes al virus.

Las iniciativas que incluyan la transformación de plantas para hacerlas más resistentes al estrés abiótico aumentando la expresión de sus enzimas antioxidantes, deberían tener en cuenta los cambios que pueden producirse en la susceptibilidad a enfermedades.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Futuras líneas de investigación deberían considerar:

a) profundizar el desarrollo de activadores de resistencia y la evaluación del costo energético de su aplicación para el hospedante, así como los posibles cambios de susceptibilidad a otras enfermedades y plagas que afectan al cultivo.

b) estudiar cómo se modifica la expresión de las enzimas antioxidantes en los sitios cercanos a la infección y en materiales resistentes y susceptibles, para esta virosis como para otras enfermedades que afecten al cultivo.

c) realizar estudios para conocer los cambios en el sistema antioxidante, el desarrollo de la infección, y la concentración viral en patosistemas donde la aplicación de altas temperaturas luego de la inoculación atenúan los síntomas de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal M., Katiyar-Agarwal S. y Grover A. 2002. Plant Hsp100 proteins: structure, function and regulation. *Plant Science* 163: 397-405.
- Alamillo J. M., Saenz P. y Garcia J. A. 2006. Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J.* 48(2): 217-227.
- Alvarez M. E., Pennell R. Y., Meier P. J., Ishikawa A., Dixon y Lamb C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- Alvarez ME 2000 Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 429-442
- Anderson J. A. 2002. Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Scientia Horticulturae* 95: 277-284.
- Aoki K., Kragler F., Xonocostle – Cázares B. y Lucas W. J. 2002. A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Plant Biology* Vol. 99 no 25: 16342-16347.
- Aparicio F., Thomas C., Lederer C., Niu Y., Wang D. y Maule A. J. 2005. Virus Induction of Heat Shock Protein 70 Reflects a General Response to Protein Accumulation in the Plant Cytosol. *Plant Physiol.* 138(1): 529–536.
- Aranda M. A., Escaler M , Wang D. y Maule A. J. 1996. Induction of HSP70 and polyubiquitin expresion associated with plant virus replication. *Proc. Nac. Acad. Sci. USA* 93: 15289-15293.
- Aranda M. y Maule A. 1998. Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology* 243: 261-267.
- Aranda M. A., Escaler M., Thomas C. L. y Maule A. J. 1999. A heat shock transcription factor in pea is differentially controlled by heat and virus replication. *The plant journal* 20 (2): 153.
- Aver'yanov, A. A., Pasechnik, T. D., Lapikova, V. P., Romanova, T. S., Gaivoronskaya, L. M., Abramova, O. S., Kuznetsov, Vl. V., Baker, C. J. 2008. Early pro-/antioxidative interplay between host and parasite. . *Journal of Plant Pathology* 90 S2.81-S2.465. pag 211.
- Baker B., Zambryski P. Staskawicz B y Dinesh-Kumar S. P. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.
- Barna B., Fodor J., Pogany M. y Király Z. 2003. Role of reactive oxygen species and antioxidant in plant disease resistance. *Pest Manag. Sci.* 59: 459-464.
- Basavaraju, P., Shetty, N. P., Shett, H. S. y Lyngs Jorgensen, H. J. 2008. NADPH oxidase mediated generation of reactive oxygen species and their antioxidants during *Colletotrichum sublineolum* infection in sorghum. *Journal of Plant Pathology* 90 S2.81-S2.465. pag 212.
- Bawden F. C. y F. M. Roberts. 1947. The influence of light intensity on the susceptibility of plants to certain viruses. *Annals of Applied Biology* 34: 286-297.
- Bawden F. C. y F. M. Roberts. 1948. Photosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses. *Annals Applied Biology* 35: 418-428.

- Beauchamp C. y Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- Beere H. M. y Green D. R. 2001. TRENDS in Cell Biology 11(1) Disponible en internet en [http:// tcb.trends.com](http://tcb.trends.com).
- Blum, A. 1988. Heat Resistance. En: *Plant Breeding for Stress Environments*. CRC Press, Inc. pp. 79-98.
- Bolwell G., Davies D., Gerrish C., Auh C. y TM M. 1998. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiology* 116: 1379-1385.
- Bolwell G. P., Bindschedler L. V., Blee K. A., Butt V. S., Davies D. R., Gardner S.L., Gerrish C. y Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53: 1367-1376.
- Borsani O., Valpuesta M. A. y Botella M. A. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 126: 1024-1030.
- Bovié C., Ongena M. y Dommes P. 2004. Cloning and expression analysis corresponding to genes activate showing systemic acquired resistance treatment. *BMC Plant Biology* 4:15.
- Bowler C., Slooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., Van Montagu M. y Inze D. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* 10: 1723-1732.
- Bowler C. y Fluhr R. 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* 5: 241-246.
- Brakke, M. K. y Samson, R. 1981. Effect of temperature on susceptibility of normal and aberrant ratio corn stocks to barley stripe mosaic and wheat streak mosaic viruses. *Phytopathology* 71: 823-824.
- Buzzard K. A., Giaccia A. J., Killender M. y Anderson R. L. 1998. *The Journal of Biological Chemistry* 273(27): 17147-17153.
- Calvo, L., Ronco, L., Rollán, C., Balatti, P. y Dal Bó, E. 2008. Virosis de pimiento en La Plata. 1º Congreso Argentino de Fitopatología. Mayo 2008, Córdoba, Argentina, pag. 275.
- Canto, T. & Palukaitis, P. (2002). A novel N gene-associated, temperature-independent resistance to the movement of Tobacco mosaic virus vectors, neutralized by a Cucumber mosaic virus RNA1 transgene. *J Virol* 76, 12908–12916.
- Chang C. C. C. 2005. Mechanisms and genes controlling the signalling network for biotic and abiotic stress defences in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn: Functional cross-talk between photo-produced reactive oxygen species, photosynthesis and plant disease defence responses. Tesis doctoral. Universidad de Estocolmo. Facultad de Ciencias. Departamento de Botánica. Disponible en internet en: <http://www.diva-portal.org/su/abstract.xsql?dbid=418>
- Chen Z., Ricigliano J. R. y Klessig D. F. 1993. Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9533-9537.

- Chen Z., Iyer S., Caplan A., Klessig D. F. y Fan B. 1997. Differential accumulation in salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol.* 114: 193-201.
- Chinnasri B., Christopher D. A. y Sipes B. S. 2006. Evidence for the induction of systemic acquired resistance (SAR) by acibenzolar in cultivated pineapple. *Acta Hort.* 702: 151-156.
- Chivasa S., Murphy A., Naylor M. y Carr J. P. 1997. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *The Plant Cell* 9: 547-557.
- Cho J. J., Mau R. F. L., Gonsalves D. y Mitchell W.C. 1986. Reservoir weed hosts of tomato spotted wilt virus. *Plant Dis.* 70: 1014-1017.
- Cho J. J., Mitchell W. C., Mau R. F. L. y Sakimura B. P. 1987. Epidemiology of tomato spotted wilt virus disease on crisphead lettuce in Hawaii. *Plant Disease* 71 (6): 505-508.
- Clark M. y A. M. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475.
- Cole A. B., Király L., Ross K., Schoelz J. E. 2001. Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to aculiflower mosaic virus infection. *Mol. Plant-Microb Interact.* 14: 31-41.
- Conrath U., Chen Z., Ricigliano J. W. y Klessig D. F. 1995. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 92: 7143.
- Córdoba A. R., Taleisnik E., Brunotto M. y Racca, R. 1991. Mitigation of tomato spotted wilt virus infection and symptom expression by water stress. *J. Phytopathology* 133: 255-263.
- Cronjé M. J. y Bornman L. 1999. Salicylic acid influences Hsp70/Hsc70 expression in *Lycopersicon esculentum*: dose- and Time-dependent induction or potentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265:422-427.
- Dal Bó E. Tospovirus. 1996. Biología molecular y diversidad en la Argentina. *Seminario Taller. Problemática de la peste negra del tomate (TSWV) y trips de las flores (Frankliniella occidentalis) en la horticultura de la región. UNLP-INTA. 19 y 20 de junio de 1996.*
- Dangl J. L., Dietrich R. A. y Richberg M. H. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell.* 8: 1793-1807.
- Dat J. F., Lopez-Delgado H., Foye, C. H. y Scott I. M. 1998. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 116: 1351-1357.
- Dat J. F., Foyer C. H. y Scott I. M. 1998. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 118:1455-1461.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inzé D. y Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 779-795.
- Dat J. F., Pellinen R., Beeckman T., Van De Cotte B., Langebartels C., Kangasjärvi J., Inzé D y Van Breusegem F. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco *The Plant Journal* 33: 621-632.
- Delaney T., Uknes S., Vernooji B., Friedrich I., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H., Ward E. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247-1250.

- De Angelis J. D., Sether D. M. y Rossignol P. A. 1994. Transmission of impatiens necrotic spot virus in peppermint by Western Flower thrips. *J. Econ. Entomol.* 87(1): 197-201.
- De Gara L., Pinto M. C. de y Tommasi F. 2003. The antioxidant systems vis -a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 863-870.
- Deller, A. S., Keon, J., Antoniw J., Hammond-Kosack, K. y Rudd, J. 2008. Functional analysis of reactive oxygen related genes in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Journal of Plant Pathology* 90 S2.81-S2.465. pag 218.
- De Nardi B., Dros R., Del Terra L., Martellosi C., Asquini E., Tornincasa P., Gasperini D., Pacchioni B., Rathinavela R., Pallavicini A. y Graziosi G. 2006. Differential responses of *Coffea arabica* L. leaves and roots to chemically induced acquired resistance. *Genome* 49(12): 1594-1605.
- Dewey R. A., Semorile L. y Grau O. 1996. Detection of Tospovirus species by RT-PCR of the N-gene and restriction enzyme digestions of the products. *J. Virol. Methods* 56: 19-26.
- Díaz-Pérez J. C., Gitaitis-R. y Mandal-B. 2007. Effects of plastic mulches on root zone temperature and on the manifestation of tomato spotted wilt symptoms and yield of tomato. *Scientia Horticulturae* 114 (2):90-95
- Díaz-Vivancos P., Rubio M., Mesonero V., Priago P. M., Barcelo A. R., Martínez-Gómez P. y Hernández J. A. 2006. The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus. *J. Exp. Bot.* 57(14): 3813-3824.
- Ding C., Wang C. Y., Gross K. C. y Smith D. L. 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science* 161: 1153-1159.
- Durner J. y Klessig D. F. 1996. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *The Journal of Biological Chemistry* 271(45): 28492-28501.
- Edreva, A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environments* 106: 119-133.
- Escaler M., Aranda M. A., Roberts I. M., Thomas C. L. y Maule A. J. 2000. A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression in pea. *Molecular Plant Pathology* 1(3): 159-167.
- El Informe Frutihortícola. Marzo 1996, pag.18.
- Inzé D. y Van Montagu M. 1995. Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 153-158.
- Finley K. W. 1953. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. *Australian Journal of Biological Science* 6: 153-163.
- Fobert P. R. y Després C. 2005. Redox control of systemic acquired resistance. *Curr Opin Plant Biol.* 8(4): 378-382.
- Fobert P. R., Shearer H., Hahn K., Wang L., Rochon A., Boyle P y Després C. 2008. Role of redox state in systemic acquired resistance. *Journal of Plant Pathology* 90(2, Supplement), S2.57
- Fodor J., Gullner G., Adam A. L., Barna B., Kömives T. y Király Z. 1997. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.* 114: 1443-151.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D., Davies J. M. y Dolan L. 2003. Reactive

- oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-6.
- Foyer C. H., Lopez Delgado H., Dat J. F. y Y. M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254.
- Francescangeli N. y Mitidieri M. 1996. El invernadero hortícola: Estructuras y Manejo de Cultivos. Carpeta Jornada de Capacitación para Productores, EEA INTA San Pedro, 70 pp. Mayo 1996.
- Friedrich L., Lawton K., Dincher S., Winter A., Staub T., Uknes S., Kessmann H. Y Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10: 61-70.
- Gabriel D. W. y Rolfe B. G. 1990. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 365-391.
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H. y Ryals, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 1993 261: 754-755.
- Gális I., Smith J. L. y Jameson P. 2004. Salicylic acid, but not cytokinin-induced, resistance to WCIMV is associated with increased expression of SA-dependent resistance genes in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 161(4): 459-466.
- Gallego S. M., Benavides M.P. y Tomaro M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121: 151-159.
- Gallie, D. R. 2002. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation thorough enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Res.* 30(15): 3401-3411.
- Gonzalez L. C. y G. S. Pound. 1963. The response to temperature of cabbage virus A infection in *Nicotiana glutinosa*. *Phytopathology* 53: 1041-1045.
- Goodman R. N., Király Z. y Wood K. R. 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press. Columbia.
- Gorlach J., Volrath S., Knauf-Beiter G., Hengy G., Beckhove U., Kogel K. H., Oostendrop M., Staub T., Ward E., Kessmann H. y Ryals J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629-643.
- Gracia O. 1996. Peste Negra. Seminario Taller. Problemática de la peste negra del tomate (TSWV) y trips de las flores (*Frankliniella occidentalis*) en la horticultura de la región. UNLP-INTA 19 y 20 de junio de 1996.
- Grupo Ghia, 2009. Jornada Ghia en Peste Negra para técnicos. La Plata, 24 de abril de 2009.
- Guzzo S. D. 2004. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tesis Doctoral. Centro de Eegía Nuclear na Agricultura, Universidad de San Pablo. Piracicaba.
- Hammond-Kosack K. E., Silverman P., Raskin I. y Jones J. D. G. 1996. Race-specific elicitors of *Cladoporium fulvum* induce changes in cell morphology and the synthesis of ethylene and salicylic acid in tomato plants carrying the corresponding Cf disease resistance gene. *Plant Physiol.* 110: 1381-1394.

- Hancock J., Desikan R., Clarke, A., Hurst, R. D. y Neill, S. J. 2002. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 611-617.
- Harper J. H. y Balke N. E. 1981. Characterization of the inhibition of K⁺ absorption in oat roots by salicylic acid. *Plant Physiol* 68: 1349-1353.
- Harrach B. D., Fodor J. y Barna B. 2005. Changes of antioxidants following powdery mildew infection of near-isogenic barley lines carrying different resistance genes. *Acta Biologica Szegediensis* 49(1-2): 91-92.
- Havelda Z. y Maule A. J. 2000. Complex spatial responses to Cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *The Plant Cell* 12: 1975-1985.
- Helms K. y G. A. Mc. Intyre. 1964. Heat-induced variations in number and size of lesions of tobacco mosaic virus on pinto bean. *Virology* 23: 565-572.
- Hoeberichts F. A. y Woltering E. J. 2002. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant -specific regulators. *BioEssays* 25: 47-57.
- Hoover K. 2004. Biology and IPM tactics for control of woody ornamental and greenhouse pests. Project 4029. Research project outline. Disponible en internet en: <http://research.cas.psu.edu/projects/PEN04029.pdf>
- Horváth E., Janda T., Szalai G. y Páldi, E. 2002. In vitro salicylic acid inhibition of cabalase activity in maize: differences between the isozymes and a posible role in the induction of chilling tolerante. *Plant Science* 163: 1129-1135.
- Huang Z., Yeakley J. M., Garcia E. W., Holdridge J. D., Fan J. B. y Whitham S. A. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiol.* 137(3): 1147-1159.
- Inoue T., Sakurai T., Murai T. y Maeda T. 2004. Specificity of accumulation and transmsion of tomato spotted wilt virus (TSWV) in two genera, *Frankliniella* and *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Bull Entomol Res.* 64(6): 501-507.
- INTA – CRBAN. 2005. DIAGNOSTICO Plataforma tecnológica regional 2005 – 2008.
- INTA – CRBAN. 2008. DIAGNOSTICO Plataforma tecnológica regional 2009 – 2011.
- Janda T., Kósa E. I., Szalai G y Páldi E. 2005. Investigation of antioxidant activity in maize during low temperature stress. *Acta Biologica Szegediensis.* 49(1-2): 53-54.
- Jarvis W. R. 1992. Managing diseases in greenhose crops. APS PRESS. The American Phytopathological Society, USA. 288 pags.
- Jeun Y. C., Siegrist J. y Buchenauer H. 2000. Biochemical and cytological studies on mechanisms of systemically induced resistenace to *Phytophthora infestnas* in tomato plants. *J. Phytopathology* 148: 129-140.
- Jordá C., Pomares F. e Iranzo B. 1996. Influencia de la nutrición nitrogenada en el desarrollo del virus TSWV en lechuga. *Agrícola Vergel Año XV* 173: 300-302.
- Kaminska M. 1993. The response of *Gerbera* cultivars at different ages to tomato spotted wilt virus infection. *Phytopathologia Polonica* 18: 81-85.
- Kassanis B. 1952. Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with viruses. *The Annals of Applied Biology* 39, No. 3: 358-369.
- Kauss H. y W. Jeblick. 1995. Pretreatment of parsley suspensión culturs with salicylic acid nhances spontaneous and lcited production of H₂O₂. *Plant Physiol.* 108: 1171-1178.
- Kessman H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J., Ward E., Uknes S., Ryals J. (1994) Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu Rev Phytopathol* 32:439–459.

- Kimmins W. C. y Litz R. E. 1967. The effect of leaf water balance on the susceptibility of French bean to Tobacco Necrosis Virus. *Canadian Journal of Botany* 45: 2115-2118.
- Király Z., Barna B., Kecskés A. y Fodor J. 2002. Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Raic. Res.* 36(9): 981-91.
- Kobayashi M., Devaraj B., Usa M., Tanno Y., Takeda M., Inaba H. 1997. Two-dimensional imaging of ultraweak photon emission from germinating soybean seedlings with a highly sensitive CCD camera. *Photochemistry and Photobiology* 65: 535-537.
- Kobayashi M., Sasaki K., Enomoto M. y Ehara Y. 2007. Highly sensitive determination of transient generation of biophotons during hypersensitive response to cucumber mosaic virus in cowpea. *Journal of Experimental Botany.* 58(3): 465-472.
- Lacasa A., Guerrero M. M., Sánchez J. A., Gutierrez L., Contreras J., Oncina M. y Torres J. 1997. Influencia del sistema de riego en la incidencia del virus del bronceado del tomate (TSWV) en cultivos de lechuga. *Agrícola Vergel* 184: 216-225.
- LeBlanc A. C. 2003. Natural cellular inhibitors of caspases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27: 215-229.
- Lee S. H. y An C. S. 2005. Differential expression of three catalase genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol. Cells* 20(2):247-255.
- Lee S. C. y Hwang B. K. 2005. Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired. *Planta* 221(6): 790-800.
- León J., Lawton M. A. y Raskin I. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108: 1673-1678.
- Li Z. y Burritt D. J. 2003. The influence of *Cocksfoot mottle virus* on antioxidant metabolism in the leaves of *Dactylis glomerata* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62(5): 285-295.
- Li, J., Zhang Z. G., Ji R., Wang Y. C., y Zheng X. B. 2006. Hydrogen peroxide regulates elicitor PB90-induced cell death and defense in non-heading Chinese cabbage. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67(3-5): 220-230.
- Llamas-Llamas M. E., Zavaleta-Mejía E., Gonzalez-Hernández V. A., Cervantes-Díaz L., Santizo-Rincon J. A. y Ochoa -Martínez D. L. 1998. Effect of temperature on symptom expression and accumulation of tomato spotted wilt virus in different host species. *Plant Pathology* 4: 341-347.
- Logegaray V., Frezza D. y Leon A. 2007. Valoración de carga térmica del personal afectado a diferentes labores en invernadero. XXX Congreso Argentino de Horticultura. I Simposio Internacional de Cultivos Protegidos. La Plata, Argentina pp 47.
- Lorenc-Kukula K., Kwiatkowska M. W., Starzycki M. y Szopa J. 2007. Engineering flax with increased flavonoid content and thus *Fusarium* resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70(1-3): 38-48.
- Louws F. J. , Wilson M., Campbell H. L., Cuppels D. A, Jones J. B., Shoemaker P. B., Sahin F. y Miller S. A. 2001. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Dis.* 85: 481-488.
- Lyon G. D. y A. C. Newton. 1999. Implementation of elicitor mediated induced resistance in agriculture. En: *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*. Agrawa, A. A., Tuzun, S. y Bent, E. editors. APS Press, 390 pp.
- Malamy J., Carr J., Klessig D. y Raskin I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.

- Malamy J., Hennig J. y Klessig D. F. 1992. Temperature dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to Tobacco Mosaic Virus infectio. *The Plant Cell* 4: 359-366.
- Malamy J., Sanchez Casas P., Henning J., Guo A. y Klessig D. 1996. Dissection of the salicylic acid signalling pathway in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 9: 474-482.
- Mancini L. 1991. Temperature e luce nella crescita delle piantine. *Colture Protette* 5: 45-48.
- Margarita P., Ciuffo M y Turina M. 2004. Resistance braking strain of Tomato spotted wilt virus (Tospovirus; Bunyaviridae) on resistant pepper cultivars in Almeria (Spain). Publicado en internet, disponible en: <http://www.bspp.org.uk/ndr/july2004/2004-34.asp>
- Maule A., Leh V. y Lederer C. 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 5, No. 4: 279-284.
- Mehdy M. 1994. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.
- Métraux J. P., Signer H., Ryals J., Ward E. y Wyss-Benz, M. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006.
- Minami K. 1995. Produçao de mudas de alta qualidade em horticultura. T. A. Queiroz, Editor. 128 pp.
- Mishina T. E. y Zeier J. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J.* 50(3): 500-513.
- Mitidieri M., Francescangeli N., Polack A., Dal Bó E. y Mitidieri, I. 1996a. Evaluación del efecto de las mallas anti-insectos en cultivos de tomate bajo cubierta. *Carpeta Jornada de Capacitación: El invernadero hortícola: Manejo de Plagas y Enfermedades*, EEA INTA San Pedro.
- Mitidieri M. e Irma de Midieri. 1996b. Evaluación de híbridos de tomate resistentes o tolerantes al virus de la peste negra del tomate. *Carpeta Jornada de Capacitación: El invernadero hortícola: Manejo de Plagas y Enfermedades*, EEA INTA San Pedro.
- Mitidieri M., Dal Bó H. y Mitidieri I. de. 2001. Evaluation of tomato hybrids resistant to TSWV under greenhouse conditions in Argentina. *Acta Horticulturae* 559 . International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates: Current trends for Sustainable Technologies. Editors: J.A. Fernández, P.F. Martínez, N. Castilla.
- Mitidieri M. 2000. Prácticas de manejo que afectan la incidencia del virus de la "peste negra del tomate" en cultivos hortícolas bajo cubierta. *Jornada de Capacitación. Cultivos de tomate bajo cubierta*. INTA San Pedro, 24 de Octubre de 2000. *Carpeta*.
- Mitidieri M. 2003. INTA Informe Proyecto Regional Hortícola 970 CRBN. "Ajuste y difusión de tecnologías para la producción diferenciada y diversificada de hortalizas y flores".
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9): 405-410.
- Moury B., Selassie K. G., Marchoux G., Daubeze A. M. y Palloix A. 1998. High temperature effects on hypersensitive resistance to Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) *European Journal of Plant Pathology* 104-5: 489-498.

- Mur L. A., Bi Y. M., Darby R. M., Firek S. y Draper J. 1997. Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal durin lesion establishment in TMV-infected tobacco. *Plant J.* 12(5): 1113-26.
- Murphy A. M., Chivasa S., Singh D. P. y Carr J. P. 1999. Salicylic acid-induced resistance to virases and other pathogens: a parting of the ways? *Trends in plant science* 4(4): 155-160.
- Murphy A. M. y Carr J. P. 2002. Salicylic acid has cell-specific effects on tobacco mosaic virus replication and cell to cell movement. *Plant Physiol* 128: 552-563.
- Musetti R., di Toppi S., Eramacora P. y Favali, M. A. 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Biochemistry and Cell Biology* 94(2): 203-208.
- Nakajima, M., Shinda, R., Maniwa, M. y Akutsu, K. 2008. Infection of tomato leaves with pathogenesis deficient strain of *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* 90 S2.81-S2.465. pag 233.
- Neill S., Desikan R. y Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388-395.
- Niggeweg R., Michael A. J. y Martin C. 2004. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22: 746-754.
- Nilson E. y Orcutt D. 1996. *Physiology of plants under stress. Abiotic Factors.* Wiley and Sons, USA, 689 pp.
- Paolacci A. R., Badiani M., D' Annibale A., Fusari A. y Matteucci G. 1997. Antioxidants and photosynthesis in the leaves of *Triticum durum*. *Journal of Plant Physiology* 150 (4): 381-387.
- Pancheva T. V., Popova L. P. y Uzunova A. N. 1996. Effects of salicylic acid on growth and phtosynthesis in barley plants. *J. Plant Physiol.* 149: 57-63.
- Pandey P., Saleh A., Nakazawa A., Kumar S., Srinivasula S. M., Kumar V., Wechselbaum R., Nalin C., Alnemri E. S., Kufe D. y Kharbanda S. 2000. *EMBO Journal* 19(16) 4310-1322.
- Paterson R. G., Scott S. J. y Gergerich R. C. 1989. Resistance in two *Lycopersicon* species to an Arkansas isolate of tomato spotted wilt virus. *Euphytica* 43: 173-178.
- Peters D., de Avila A. C., Kitajima E. W., Rsenda R. de, Haan P. de y Goldbach R. W. 1991. An overview of tomato spotted wilt virus. En: *Virus-Thrips-Plant Interaction of tomato spotted wilt virus.* H. T. Hsu, R. H. Lawson, eds. *Proc. USA Workshop, US Dep. Agric, Agric. Res. Serv. ARS-87* pp 1-14.
- Picó B.; Herraiz J.; Ruiz J. J. y Nuez F. 2002. Widening the genetic basis of virus resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 94: 73-89.
- Piris E., Saliva V., Brambilla V., Clié R., Piris M., Segade G., Diz J. y Mitidieri M. S. 2007. Efecto de la aplicación de un activador de resistencia y nuevos productos cúrpicos en el control de la cancrrosis de los cítricos. *XXX Congreso Argentino de Horticultura. I Simposio Internacional de Cultivos Protegidos.* La Plata, Argentina pp 204.
- Popova L., Ananieva E., Hristova V., Christov K., Georgieva K., Alexieva V., Stoionova Zh. 2003. Salicylic acid-and methyl jasmonate –induced protection on phtosynthesis to paraquat oxidative stress. *Bulg. J. Plant. Physiol, Special Issue* 133-152.
- Raj N. y Shetty H. S. 2008. PGPR induced histochemical changes during induction of resistance in pearl millet. *Journal of Plant Pathology* 90 S2.81-S2.465. pag 257.

- Rao M., Paliyath G., Ormrod D. P., Murr D. P. y Watkins C. B. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production , oxidative stress , and H₂O₂ metabolizing enzymes. *Plant Physiol* 115: 137-149.
- Raskin I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 1992 43:439-463.
- Rasmussen J. B., Hammerschmidt R. y Zook M. N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* 97: 1342-1347.
- Riedle-Bauer, M. 2000. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections in plants. *Journal of Phytopathology* 148 (5) pp 297.
- Rivero R. M., Sánchez E., Ruiz J. M. y Romero L. 2003. Influence of temperature on biomass, iron metabolism and some related bioindicators in tomato and watermelon plants. *J. Plant Physiol.* 160: 1065-1071.
- Rizhsky L., Liang H. y Mittler R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143-1151.
- Roggero P., Masenga V., Tasella L. 2002. Field isolates of Tomato spotted wilt virus overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Disease* 86: 950-954.
- Romero A. M., Kousik C. S. y Ritchie D. F. 2001. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar –S-methyl. *Plant Dis.* 85: 189-194.
- Ruess W. 1998. Field experience with CGA 245704 in a range of crop plants. *SCI Conference on systemic acquired resistance*, 10 th March 1998. Abstract.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Turrà, D., Reverberi, M., Tucci, M., De Masi, L., Vinal, F., Marra, R., Aloy, V., Woo, S. y Lorito, M. 2008. Protein hytral secreted by *Trichoderma* plays a key role in induced systemic resistance. *Journal of Plant Pathology* 90 S2.81-S2.465. pag 259.
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willis M. G., Molina A., Steiner H. y M. D. Hunt. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819.
- Sainis I., Angelidis C., Pagoulatos G. y Lazaridis I. 1994. The hsc70 gen which is slightly induced by heat is the main virus inducible member of the hsp70 gene family. *FEBS Letters* 355: 282-286.
- Sanmartin M., Drogondi P. D., Lyons T., Pateraki I., Barnes J. y Kenellis A. K. 2003. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* 216: 918-928.
- Sarowar S., Kim E. N., Kim Y. J., Ok S. H., Kim K. D., Hwang B. K. y Shin J. S. 2005. Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. *Plant Cell Reports* 24(4): 216-224.
- SAS Institute Inc. 1993. *SAS/STAT Users's guide*, Release 6.03 Edition.
- Scheibel T. y Buchner J. 1998. The Hsp90 complex- A super chaperone machine as a novel drug target. *Biochemical Pharmacology* 56: 675-682.
- Schereier, P. 2001. Scientific Report. Max Planck Institute for Plant Breeding Research. Disponible en internet en: <http://www2.mpiz-koeln.mpg.de/~pr/ScientificReport2001.pdf>
- Schettel N. L. y Balke N. E. 1983. Plant growth response to several allelopathic chemicals. *Weed Sci.* 31: 293-298.

- Schoeneweiss D. F. 1975. Predisposition, stress and plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13: 193-211.
- Scholthof, H. B. 2005. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends in plant science* 10(8): 1380-1385.
- Senaratna T., Touchell D., Bunn E. y Dixon K. 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* 30: 157-161.
- Shaner G. y Finney E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slowmildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 77: 1051-1056.
- Sharma Y. K, León J. , Raskin I. , Davis K. R. 1996. Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*—the role of salicylic acid in the accumulation of defence-related transcripts and induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;**93**:5099–5104.
- Silverman F. P., Petracek P. D. , Heiman D. F. , Fledderman C. M. y Warrior P. 2005. Salicylate activity. 3. Structure relationship to systemic acquired. *J Agric Food Chem.* 53(25): 9775-80.
- Soellick T. R., Uhrig J. F., Bucher G. L., Kellmann J. W. y Schreier P. H. 2000. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *PNAS* 97 (5): 2373-2378.
- Soler S., Diez M. J. y Nuez F. 1998. Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV -resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant disease* 82 (11): 1199-1204.
- Spletzer M. E. y Enyedi A. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* 89: 722-727.
- Staub T. 2001. Induced Disease Resistance in Crop Health Management. *Plant Health Progress.*
- Sticher L., Maauch-mani B. y Métraux J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270.
- Stone J. M., Heard J. E., Asai T., y Ausubel F. M. 2000. Simulation of Fungal-Mediated Cell Death by Fumonisin B1 and Selection of Fumonisin B1-Resistant (fbr) *Arabidopsis* Mutants. *Plant Cell* 12: 1811-1822.
- Sullivan C. S. y Pipas J. M. 2001. The virus-chaperone connection. *Virology* 287: 1-6.
- Szepesi Á., Csiszár J., Bajkán S., Gémes K., Horváth F., Erdei L., Deér A. K., Simon M.L. y Tari I. 2005. Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt-and osmotic stress. *Acta Biologica Szegediensis* 49(1-2) 123-125.
- Tally A., Ostendorp M., Lawton K., Staub T. y Bassi B. 1999. Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. En: *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*. Agrawa, A. A., Tuzun, S. y Bent, E. editors. APS Press, 390 pp.
- Taiz L. y Zeiger E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. 792 pp.
- Thulke O. y U. Conrath. 1998. Salicylic acid has a dual role in activation of defence-related genes in parsley. *The Plant Journal* 14(1): 35-42.
- Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. y Aleš L. 2006. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68(1-3): 22-32.

- Tu, J. C. 1989. The role of temperature and inoculum concentration in the development of tip necrosis and seedling death of beans infected with bean yellow mosaic virus. *Plant Disease* 73: 405-407.
- Ullman D. E., Meideros R., Campbell L. R. Whitfield A. E., Sherwood J. L. y German T. L. 2002. Thrips as vectors of tospovirus. *Adv. Botanical Res.* 36: 113-140.
- USDA. 2003. Helping Plants Defend Themselves. *Agricultural Research Magazine*. Disponible en internet en: www.ars.usda.gov/is/pr/2003/031202.htm.
- Uviedo, R. 1999. Boletín Meteorológico EEA INTA San Pedro. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/met/planillas_mensuales/1999/. Consultado el 25 /05/2009.
- Uviedo, R. 2000. Boletín Meteorológico EEA INTA San Pedro. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/met/planillas_mensuales/2000/. Consultado el 25 /05/2009.
- Uviedo, R. 2004. Boletín Meteorológico EEA INTA San Pedro. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/met/planillas_mensuales/2004/. Consultado el 25 /05/2009.
- Uviedo, R. 2005. Boletín Meteorológico EEA INTA San Pedro. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/met/planillas_mensuales/2005/. Consultado el 25 /05/2009.
- Uzunova A. N. y L.P. Popova L. P. 2000. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Contents of photosynthetica* 38 (2): 243-250.
- Valkonen J. P. T. y Watanabe K. N. 1999. Autonomus cell death, temperature sensitivity and the genetic control associated with resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in diploid potatoes (*Solanum* spp.) *Theoretical and applied genetics*. 99(6): 996-1005.
- Vaux D. L. 2002. Apoptosis and toxicology -what relevance? *Toxicology* 181-182:3-7.
- Venisse J. S., Gullner G. y Brisset M. N. 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol* 12: 2164-72.
- Vinocur B. y Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress.: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.
- von Barga S., Salchert K., Paape M., Picchulla B. y Kellmann, J. W. 2001. Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and DnaJ-like chaperones. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 1083-1093.
- Wang L. J. y Li S. H. 2005. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca²⁺ homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science* 170(4): 685-694.
- White R. F., Antoniw J. F., Carr J. P. y Woods R. D. 1983. The effects of aspirin and polyacrylic acid on the multiplication and spread of TMV in different cultivars of tobacco with and without the N-gene. *Phytopathologische Zeitschrift* 107, 224-232.
- Whitham, S. A., Quan, S., Chang, H.-S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X. & Hou, Y.-M. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* 33, 271–283
- Wu J. H., Blakely L. M. y Dimitman J. E. 1969. Inactivation of a host resistance mechanism as an explanation for heat activation of TMV-infected Bean Leaves. 1969. *Virology* 37: 658-666.

- Williams L. V., López Lambertini P., Shohara K., Usugi T y E. Biderbost. 1997. Prospección de tospovirus en zonas de producción de tomate en Argentina. Resumen. XX Congreso Argentino de Horticultura. Bahía Blanca, Argentina. Septiembre 1997.
- Williams L. V., López Lambertini P., Shohara K. y E. Biderbost. 2001. Occurrence and Geographical Distribution of Tospovirus Species Infecting Tomato Crops in Argentina. *Plant Disease* 85 (12):1227-1229.
- Wiltshire, G. H. 1956. The effect of darkening on the susceptibility of plants to infection with viruses. *Ann. Appl. Biol.* 44(2):249-255.
- Yakimova E. T., Kapchina-Toteva V. M., Laarhoven L. J., Harren F. M. y Woltering E. J. 2006. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 581-589.
- Yalpani N., Silverman P., Wilson T. M. A. Kleier D. A. y Raskin, I. 1991. Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell.* 3: 809-818.
- Yalpani N., León J., Lawton M. A. y Raskin I. 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 315-321.
- Yarwood C. E. 1958. Heat activation of virus infections. *Phytopathology* 48: 39-46.
- Yarwood C. E. 1976. Modification of the host response-predisposition. Physiological plant pathology. Heitefuss, R. y Williams, P. H. eds. Cap 6. pp 703-718. En: *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol 4.* Pirson, A. y Zimmerman, M. H. Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 890 pp.
- Yi S. Y., Yu S. H. y Choi, D. 1999. Molecular cloning of catalase cDNA from *Nicotiana glutinosa* L., and its repression by Tobacco Mosaic Virus infection. *Mol. Cells* 9: 320-325.
- Yi S. Y., Yu S. H. y Choi D. 2003. Involvement of hydrogen peroxide in repression of catalase in TMV-infected resistant tobacco. *Mol. Cells.* 15(3): 364-369.
- Zhang S. y Klessig D. F. 1997. Salicylic Acid Activates a 48-kD MAP Kinase in Tobacco. *The Plant Cell* Vol 9 No 5: 809-824
- Zhang S. y Klessig D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.*6:520-527.
- Zhang Z. G., Wang Y. C., Li J., Ji R., Shen G., Wang S. C., Zhou X. y Zheng X. B. 2004. The role of SA in the hypersensitive response and systemic acquired resistance induced by elicitor PB90 from *Phytophthora boehmeriae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65(1): 31-38.
- Zheng, C., Chen, P. y Gergerich, R. 2005. Effect of temperature on the expression of necrosis in soybean infected with soybean mosaic virus. *Crop. Sci.* 45: 916-922.
- Zhu Y. J., Qiu X., Moore P. H., Borth W., Hu J., Ferreira S. y Albert H. H. 2004. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63(5): 237-248.

ANEXO 1

Tablas de análisis de variancia

Tabla 2.1 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para altura (cm) a los 15 días de la inoculación, materia seca total por planta (g/planta) y tasa relativa de crecimiento (cm/día)/altura final). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| FV | gl | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | | Repetición 3 | | |
|-------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|--------------|----------|-----------------|
| | | ALT 15 F | MS F | TRC F | ALT 15 F | MS F | TRC F | ALT 15 F | MS F | TRC F |
| Estrés | 1 | 8.79 ** | 14.61 ** | 5.49 ** | 0.35 NS | 2.79 NS | 4.53 * | 0.20 NS | 1.34 NS | 4.64 * |
| Virus | 1 | 50.5 ** | 39.59 ** | 51.33 ** | 207.17 ** | 78.19 ** | 173.42 ** | 213.79 ** | 78.75 ** | 74.18 ** |
| Estrés * | 1 | 1.59 NS | 0.55 NS | 0.60 NS | 4.37 * | 0.09 NS | 0.50 NS | 3.17 NS | 0.17 NS | 0.01 NS |
| Virus | | | | | | | | | | |
| | R ² | 0.65 | 0.61 | 0.64 | 0.87 | 0.84 | 0.73 | 0.92 | 0.72 | 0.83 |
| | CV | 14.18 | 33.4 | 19.14 | 8.77 | 23.69 | 14.70 | 8.24 | 21.15 | 15.54 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), Virus= plantas inoculadas con una cepa de TSWV, Control = plantas mantenidas a 25 °C, Sanas= plantas no inoculadas, ALT15= altura a los 15 días de la inoculación, MS= materia seca total por planta, TRC= tasa relativa de crecimiento.

Tabla 2.2 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para severidad de síntomas a inicios y fin de la evaluación y días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| | | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | | Repetición 3 | | |
|----------------|----|--------------|----------|--------|--------------|--------|---------|--------------|--------|---------|
| FV | gl | S6 | S13 | DAS | S7 | S12 | DAS | S6 | S12 | DAS |
| | | F | F | F | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 1 | 2.18 NS | 49.36 ** | 7.35 * | 0.06 NS | 8.21 * | 0.52 NS | 1.12 NS | 4.50 * | 1.17 NS |
| R ² | | 0.13 | 0.77 | 0.33 | 0.006 | 0.43 | 0.05 | 0.07 | 0.22 | 0.07 |
| CV | | 171.95 | 13.15 | 9.11 | 172.94 | 28.37 | 10.42 | 240.00 | 31.58 | 20.88 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C). S6, S7, S12 y S13: severidad de síntomas sistémicos a los 6, 7, 12 y 3 días de la inoculación respectivamente. DAS = días desde inoculación hasta aparición de síntomas.

Tabla 2.3 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para test de ELISA (Absorción a 410 nm) al folíolo inoculado y folíolo apical. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repeticiones 2 y 3.

| | | Repetición 2 | | | Repetición 3 | |
|----------------|----|--------------|---------|--------|--------------|---------|
| FV | gl | INOC 5 | API 10 | INOC 5 | API 5 | API 10 |
| | | F | F | F | F | F |
| Estrés | 1 | 0.29 NS | 2.13 NS | 6.88 * | 6.80 * | 0.13 NS |
| R ² | | 0.01 | 0.08 | 0.17 | 0.36 | 0.04 |
| CV | | 49.25 | 2.06 | 34.19 | 40.15 | 10.51 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C). INOC5= folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación, API5 y API10= folíolo apical a los 5 y 10 días de la inoculación.

Tabla 2.4 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para rendimiento total (kg/planta), descarte total (%), causas de descarte (%) y porcentaje de frutos comerciales chico, mediano y grande. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| | | CAUSAS DE DESCARTE | | | | | TAMAÑO FRUTO COMERCIAL | | | |
|----------------|----|--------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | TOTAL | DESCARTE | VIROSICO | PEQUEÑO | DEFORME | RAJADO | CHICO | MEDIANO | GRANDE |
| FV | gl | F | F | F | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 1 | 4.95 * | 0.84 NS | 1.85 NS | 1.84 NS | 0.58 NS | 1.92 NS | 8.64 ** | 1.70 NS | 3.24 NS |
| Virus | 1 | 10.69 ** | 14.73 ** | 25.77 ** | 3.63 NS | 0.02 NS | 16.15 ** | 12.21 ** | 0.02 NS | 15.19 ** |
| Estrés * | 1 | 4.45 * | 0.55 NS | 1.90 NS | 0.76 NS | 0.02 NS | 2.50 NS | 12.28 ** | 8.03 ** | 0.61 NS |
| virus | | | | | | | | | | |
| R ² | | 0.27 | 0.22 | 0.34 | 0.10 | 0.01 | 0.26 | 0.37 | 0.15 | 0.28 |
| CV | | 44.21 | 37.10 | 102.79 | 72.77 | 66.62 | 49.67 | 66.33 | 63.07 | 50.38 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), Virus= plantas inoculadas con una cepa de TSWV, Control = plantas mantenidas a 25 °C, Sanas= plantas no inoculadas. TOTAL = rendimiento total por planta, DESCARTE = porcentaje total de descarte, CHICO = frutos entre 100 - 150 g, MEDIANO = frutos entre 150 – 200 g y GRANDE = frutos > 200 g.

Tabla 2.5 Análisis de variancia para altura (cm) a los 15 días de la inoculación, materia seca total por planta (g/planta) y tasa relativa de crecimiento (cm/día)/altura final). Híbrido Gol resistente a TSWV.

| FV | gl | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | |
|----------------|----|---------------|---------------|----------|--------------|---------|----------|
| | | ALT 15 F | MS F | TRC F | ALT 15 F | MS F | TRC F |
| Estrés | 1 | 0.67 NS | 0.30 NS | 0.62 NS | 0.09 NS | 1.96 NS | 0.00 NS |
| Virus | 1 | 6.72 * | 4.80 * | 2.59 NS | 0.02 NS | 0.96 NS | 0.31 NS |
| Estrés * | 1 | 1.08 NS | 0.96 NS | 0.59 NS | 0.72 NS | 0.13 NS | 0.15 NS |
| Virus | | | | | | | |
| R ² | | 0.19 | 0.15 | 0.09 | 0.06 | 0.16 | 0.03 |
| CV | | 8.45 | 35.09 | 3.79 | 8.80 | 28.80 | 6.58 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), Virus= plantas inoculadas con una cepa de TSWV, Control = plantas mantenidas a 25 °C, Sanas= plantas no inoculadas, ALT15= altura a los 15 días de la inoculación, MS= materia seca total por planta, TRC= tasa relativa de crecimiento.

Tabla 2.6 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para número de lesiones locales en el folíolo inoculado a inicios y fin de la evaluación y número de folíolos inoculados muertos. Híbrido Gol resistente a TSWV

| FV | gl | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | |
|----------------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|---------|
| | | L 6 F | L 11 F | FM F | L 4 F | L 13 F | FM F |
| Estrés | 1 | 21.70 ** | 41.60 ** | 10.74 ** | 15.28 ** | 8.21 * | 0.52 NS |
| Folíolo | 1 | 5.71 * | 9.69 ** | - | 0.02 NS | 0.07 NS | - |
| R ² | | 0.45 | 0.61 | 0.39 | 0.54 | 0.43 | 0.05 |
| CV | | 16.82 | 15.90 | 3.75 | 18.63 | 28.37 | 10.42 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), Virus= plantas inoculadas con una cepa de TSWV, Control = plantas mantenidas a 25 °C, Sanas= plantas no inoculadas. L 6, L 4, L11 y LES 13: lesiones a los 6, 4, 11 y 13 días de la inoculación respectivamente, FM = folíolos inoculados muertos.

Tabla 2.7 Efecto del estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para absorción a 410 nm correspondiente al test de ELISA en el folíolo inoculado y folíolo apical. Híbrido Gol resistente a TSWV

| | | Repetición 1 | Repetición 2 |
|--------|----------------|--------------|-----------------|
| FV | gl | F | F |
| Estrés | 1 | 5.90 * | 24.49 ** |
| | R ² | 0.23 | 0.71 |
| | CV | 44.48 | 18.67 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), Control = plantas mantenidas a 25 °C.

Tabla 2.8.1 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para severidad de síntomas sistémicos a inicios y fin de la evaluación y días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas para las repeticiones 1, 2 y 3. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| | | S 5 | AREA | DAS |
|--------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| FV | gl | F | F | F |
| Estrés | 4 | 4.24 ** | 3.72 ** | 3.16 * |
| Rep | 2 | 1.14 NS | 0.16 NS | 1.78 NS |
| | R ² | 0.08 | 0.06 | 0.10 |
| | CV | 7.69 | 27.08 | 15.12 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizados los tratamientos de estrés (1, 4, 8 y 24 hs a 40 °C y Control = plantas mantenidas a 25 °C). S 5: severidad de síntomas sistémicos a los 5 días de la inoculación AREA= Area bajo la curva de progreso de la enfermedad, se calculó según una ecuación que utiliza los valores de severidad tomados durante los 15 días posteriores a la inoculación. DAS = días desde inoculación hasta aparición de síntomas.

Tabla 2.8.2 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia por repetición para severidad de síntomas a los 5 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| FV | gl | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | | Repetición 3 | | |
|----------------|----|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|
| | | S 5 | AREA | DAS | S 5 | AREA | DAS | S 5 | AREA | DAS |
| | | F | F | F | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 4 | 1.24 | 2.20 | 2.42 | 3.44 | 2.15 | 1.36 | 1.68 | 1.26 | 0.55 |
| | | NS | NS | NS | * | NS | NS | NS | NS | NS |
| R ² | | 0.10 | 0.17 | 0.20 | 0.14 | 0.10 | 0.11 | 0.07 | 0.05 | 0.04 |
| CV | | 8.36 | 13.83 | 15.25 | 6.38 | 31.87 | 12.79 | 8.44 | 27.83 | 16.99 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de finalizados los tratamientos de estrés (1, 4, 8 y 24 hs a 40 °C y Control = plantas mantenidas a 25 °C). S 5: severidad de síntomas sistémicos a los 5 días de la inoculación AREA= Area bajo la curva de progreso de la enfermedad, se calculó según una ecuación que utiliza los valores de severidad tomados durante los 15 días posteriores a la inoculación. DAS = días desde inoculación hasta aparición de síntomas.

Tabla 2.9.1 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para número y diámetro de lesiones locales a inicios y fin de la evaluación, días hasta aparición de lesiones y porcentaje de folíolos inoculados con lesiones. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 1.

| FV | gl | L 5 | L 15 | D 5 | D 15 | DAS | FOL |
|----------------|----|---------------|---------------|---------|---------|---------|----------------|
| | | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 4 | 2.51 * | 3.17 * | 1.31 NS | 0.74 NS | 0.43 NS | 4.55 ** |
| R ² | | 0.19 | 0.22 | 0.15 | 0.09 | 0.05 | 0.29 |
| CV | | 7.84 | 34.52 | 191.49 | 82.59 | 14.59 | 36.05 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). L 5, D 5 , L 15 y D15: número (L) y diámetro (D) de lesiones a los 5, y 15 días de la inoculación respectivamente, FOL = folíolos inoculados con lesiones, DAS = días hasta aparición de síntomas.

Tabla 2.9.2 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis de variancia para número y diámetro de lesiones locales a inicios y fin de la evaluación, días hasta aparición de lesiones y porcentaje de folíolos inoculados con lesiones. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 2.

| FV | gl | L 5 | L 15 | D 5 | D 15 | DAS | FOL |
|----------------|----|---------|---------|----------------|---------|---------|---------|
| | | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 4 | 1.51 NS | 2.14 NS | 16.28 * | 0.84 NS | 0.78 NS | 2.06 NS |
| R ² | | 0.13 | 0.17 | 0.92 | 0.27 | 0.26 | 0.17 |
| CV | | 9.98 | 14.23 | 12.67 | 48.99 | 19.08 | 48.78 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). L 5, D 5 , L 15 y D15: número (L) y diámetro (D) de lesiones a los 5, y 15 días de la inoculación respectivamente, FOL = folíolos inoculados con lesiones, DAS= días hasta aparición de síntomas.

Tabla 2.10 Efecto de distintas horas de estrés térmico antes de la inoculación. Análisis para test de ELISA (Absorción a 410 nm) para folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación y folíolo apical a los 5 y 10 días de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repeticiones 1 y 2.

| FV | gl | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | |
|----------------|----|--------------|---------|---------------|--------------|---------------|---------|
| | | INOC 5 | API 5 | API 15 | INOC 5 | API 5 | API 15 |
| | | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 4 | 1.85 NS | 0.65 NS | 2.61 * | 2.14 NS | 3.01 * | 0.98 NS |
| R ² | | 0.15 | 0.06 | 0.20 | 0.16 | 0.23 | 0.08 |
| CV | | 25.93 | 9.02 | 7.44 | 97.18 | 28.85 | 151.66 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C), INOC 5= folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación, API 5 y API 15 = folíolo apical a los 5 y 15 días de la inoculación.

Tabla 2.11 Duración del efecto del estrés térmico. Análisis para severidad de síntomas a los 13 y 6 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas, repeticiones 1 y 2. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| FV | Gl | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | |
|----------------|----|--------------|-----------|----------|--------------|----------------|----------------|
| | | S 13 F | AREA F | DAS F | S 6 F | AREA F | DAS F |
| Estrés | 4 | 1.19 NS | 2.30 NS | 1.20 NS | 1.09 NS | 5.75 ** | 5.29 ** |
| R ² | | 0.05 | 0.09 | 0.08 | 0.04 | 0.19 | 0.44 |
| CV | | 4.84 | 23.13 | 8.64 | 5.54 | 34.54 | 13.15 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). S 13 y S 6 =severidad de síntomas sistémicos a los 13 y 6 días de la inoculación, AREA= área bajo la curva de progreso de la enfermedad, DAS= días hasta aparición de síntomas.

Tabla 2.12.1 Duración del efecto del estrés térmico. Análisis de variancia para número y diámetro de lesiones locales a inicios y fin de la evaluación, días hasta aparición de lesiones y porcentaje de folíolos inoculados con lesiones.. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 1.

| FV | Gl | L 5 | L 17 | D 5 | D 17 | DAS | FOL |
|----------------|----|---------|---------------|---------|---------|---------|----------------|
| | | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 4 | 1.79 NS | 2.85 * | 9.79 NS | 1.39 NS | 3.49 NS | 4.77 ** |
| R ² | | 0.14 | 0.20 | 0.95 | 0.21 | 0.54 | 0.30 |
| CV | | 6.46 | 19.06 | 8.62 | 59.62 | 18.67 | 23.45 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés= plantas inoculadas después de 1, 4, 8 y 24 horas de estrés térmico (40 °C) y control (25 °C). L 5, L 17, D 5 Y D17: número y diámetro de lesiones locales a los 5 y 17 días de la inoculación respectivamente, DAS = días hasta aparición de síntomas, FOL= porcentaje de folíolos inoculados con lesiones.

Tabla 2.12.2 Duración del efecto del estrés térmico. Análisis de variancia para número y diámetro de lesiones locales a inicios y fin de la evaluación, días hasta aparición de lesiones y porcentaje de folíolos inoculados con lesiones. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 2.

| | | L 6 | L 20 | D 6 | D 20 | DAS | FOL |
|--------|----------------|---------|---------|-----|---------------|---------------|---------|
| FV | Gl | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 4 | 1.00 NS | 2.42 NS | - | 4.87 * | 3.88 * | 2.35 NS |
| | R ² | 0.08 | 0.18 | - | 0.59 | 0.59 | 0.17 |
| | CV | 3.16 | 8.21 | - | 35.58 | 16.97 | 38.95 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo. Estrés = plantas inoculadas después 1, 4, 8 y 24 horas de estrés (40 °C), L 6, L 20, D 6 Y D 20: número y diámetro de lesiones locales a los 6 y 20 días de la inoculación respectivamente, DAS = días hasta aparición de síntomas, FOL= porcentaje de folíolos inoculados con lesiones.

Tabla 3.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para severidad de síntomas a 6 y 7 días de la inoculación (S 6 y S 7), área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AREA), días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas (DAS). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| | | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | |
|----------------------|----------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| FV | gl | S 6 | AREA | DAS | S 7 | AREA | DAS |
| | | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 1 | 1.06 NS | 20.94 ** | 6.61 * | 5.75 * | 0.42 NS | 8.67 ** |
| AS | 1 | 2.94 NS | 1.84 NS | 3.05 NS | 3.34 NS | 9.41 ** | 2.38 NS |
| Estrés * AS | 1 | 1.06 NS | 5.11 * | 0.84 NS | 3.34 NS | 4.13 * | 2.49 NS |
| R² | | 0.14 | 0.47 | 0.26 | 0.26 | 0.48 | 0.58 |
| CV | | 335.26 | 11.08 | 9.90 | 5.30 | 15.35 | 11.68 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. Estrés = plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), AS= Aplicación de ácido salicílico 1 mM antes de la inoculación.

Tabla 3.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Porcentaje de folíolos apicales ELISA + a los 15 días de la inoculación. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| | | Porcentaje de folíolos apicales ELISA + a los 15 días de la inoculación |
|----------------------|----------|---|
| FV | gl | |
| Estrés | 1 | 8.32 * |
| AS | 1 | 8.32 * |
| Estrés * AS | 1 | 0.19 ns |
| R² | | 0.84 |
| CV | | 18.56 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R² = Coeficiente de determinación, CV = Coeficiente de variación, F= valor de F, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. Estrés = plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), AS= Aplicación de ácido salicílico 1 mM antes de la inoculación.

Tabla 3.3.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento total (g/planta), porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, podredumbre apical, virósico y descarte total. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repetición 1.

| | Total | Pequeño | Rajado | Deforme | Pod apical | Virósico | Descarte |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| FV | F | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 6.02 * | 7.35 * | 0.75 NS | 2.86 NS | 0.93 NS | 1.56 NS | 1.84 NS |
| AS | 2.37 NS | 0.27 NS | 1.10 NS | 0.04 NS | 0.24 NS | 5.26 * | 1.02 NS |
| Estrés * AS | 0.01 NS | 6.55 * | 0.11 NS | 0.09 NS | 2.15 NS | 3.81 NS | 2.86 NS |
| VIR | 82.29 ** | 15.29 ** | 10.53 ** | 15.36 ** | 36.49 ** | 156.86 ** | 117.58 ** |
| Estrés*VIR | 1.19 NS | 0.11 NS | 4.13 * | 0.60 NS | 0.93 NS | 2.49 NS | 0.38 NS |
| AS*VIR | 1.03 NS | 0.18 NS | 4.22 * | 0.49 NS | 0.24 NS | 5.78 * | 0.91 NS |
| R² | 0.77 | 0.54 | 0.44 | 0.42 | 0.59 | 0.87 | 0.82 |
| CV | 44.14 | 154.76 | 104.67 | 154.79 | 132.34 | 34.25 | 14.99 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= 24hs a 40 °C previo a la inoculación; AS=Acido salicílico (1 mM), previo a la inoculación; VIR=Inoculado con una cepa de TSWV.

Tabla 3.3.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento total (g/planta), porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, virósico y descarte total. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repetición 2.

| | Total | Pequeño | Rajado | Deforme | Virósico | Descarte |
|----------------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| FV | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 0.50 NS | 10.55 ** | 0.48 NS | 0.19 NS | 4.79 * | 0.13 NS |
| AS | 0.18 NS | 1.35 NS | 0.02 NS | 0.44 NS | 0.00 NS | 1.16 NS |
| Estrés * AS | 1.61 NS | 1.67 NS | 2.00 NS | 1.58 NS | 0.29 NS | 0.39 NS |
| VIR | 33.7 ** | 5.27 ** | 68.14 ** | 3.61 NS | 79.31 ** | 3.36 NS |
| Estrés*VIR | 0.13 NS | 1.70 NS | 3.49 NS | 0.00 NS | 4.83 * | 0.24 NS |
| AS*VIR | 0.25 NS | 1.46 NS | 1.87 NS | 0.86 NS | 0.01 NS | 0.00 NS |
| R² | 0.45 | 0.37 | 0.68 | 0.14 | 0.70 | 0.12 |
| CV | 71.88 | 83.25 | 51.57 | 320.84 | 88.7 | 27.56 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= 24hs a 40 °C previo a la inoculación; AS=Acido salicílico (1 mM), previo a la inoculación; VIR=Inoculado con una cepa de TSWV.

Tabla 3.4.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (g/planta), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 - 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repetición 1.

| | COMERCIAL | CHICO | MEDIANO | GRANDE |
|----------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| FV | F | F | F | F |
| Estrés | 6.64 * | 1.13 NS | 4.30 NS | 0.01 NS |
| AS | 2.67 NS | 0.16 NS | 8.86 * | 0.35 NS |
| Estrés * AS | 0.66 NS | 0.09 NS | 0.80 NS | 0.04 NS |
| VIR | 65.15 ** | 2.16 NS | 3.74 NS | 0.54 NS |
| Estrés*VIR | 1.02 NS | - | - | - |
| AS*VIR | 0.01 NS | - | - | - |
| R² | 0.74 | 0.28 | 0.70 | 0.07 |
| CV | 76.50 | 49.31 | 73.99 | 48.52 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= 24hs a 40 °C previo a la inoculación; AS=Acido salicílico (1 mM), previo a la inoculación; VIR=Inoculado con una cepa de TSWV.

Tabla 3.4.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (g/planta), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 - 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repetición 2.

| | COMERCIAL | CHICO | MEDIANO | GRANDE |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| FV | F | F | F | F |
| Estrés | 0.02 NS | 0.10 NS | 0.22 NS | 0.91 NS |
| AS | 0.10 NS | 0.04 NS | 1.98 NS | 3.56 NS |
| Estrés * AS | 0.00 NS | 0.28 NS | 0.05 NS | 1.12 NS |
| VIR | 4.54 * | 0.61 NS | 0.00 NS | 0.63 NS |
| Estrés*VIR | 0.81 NS | 0.01 NS | 0.08 NS | 0.02 NS |
| AS*VIR | 0.49 NS | 0.93 NS | 4.13 NS | 2.56 NS |
| R² | 0.16 | 0.30 | 0.37 | 0.32 |
| CV | 156.04 | 128.57 | 82.98 | 152.81 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= 24hs a 40 °C previo a la inoculación; AS=Acido salicílico (1 mM), previo a la inoculación; VIR=Inoculado con una cepa de TSWV.

Tabla 3.5.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para número (L 5 y L 11) y diámetro de lesiones locales (D 5 y D 11) a inicios y fin de la evaluación (5 y 11 días de la inoculación respectivamente). Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 1.

| | | L 5 | L 11 | D 5 | D 11 |
|----------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>FV</i> | <i>gl</i> | F | F | F | F |
| Estrés | 1 | 4.15 * | 4.18 * | 3.40 NS | 3.03 NS |
| AS | 1 | 6.88 ** | 6.87 ** | 0.25 NS | 3.76 NS |
| Estrés * AS | 1 | 3.43 NS | 1.35 NS | 0.19 NS | 4.59 * |
| R² | | 0.37 | 9.30 | 0.69 | 0.63 |
| CV | | 24.19 | 46.67 | 41.90 | 50.86 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, Estrés = plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C). AS= Aplicación de ácido salicílico 1 mM.

Tabla 3.5.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación ANOVA para número (LES 5 y LES 15) y diámetro de lesiones locales (DIAM 5 Y DIAM 15) a inicios y fin de la evaluación (5 y 15 días de la inoculación respectivamente). Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 2.

| | | L 5 | L 15 | D 5 | D 15 |
|----------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>FV</i> | <i>gl</i> | F | F | F | F |
| Estrés | 1 | 7.68 ** | 2.25 NS | 0.00 NS | 1.64 NS |
| AS | 1 | 1.47 NS | 1.32 NS | 0.00 NS | 0.73 NS |
| Estrés * AS | 1 | 1.47 NS | 0.14 NS | 5.03 NS | 0.86 NS |
| R² | | 0.40 | 0.29 | 0.56 | 0.94 |
| CV | | 20.37 | 29.56 | 41.60 | 50.30 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, Estrés = plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C). AS= Aplicación de ácido salicílico 1 mM.

Tabla 3.6 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para test de ELISA (Absorción a 410 nm) para folíolo inoculado a los 5 días de la inoculación (INOC5) y folíolo apical a los 5 (API5) y 10 (API10) días de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV.

| | | Repetición 1 | | Repetición 2 |
|----------------------|----------|-----------------|-----------------|----------------|
| FV | gl | INOC 5 | API 15 | INOC 5 |
| Estrés | 1 | 0.58 NS | 10.15 ** | 0.13 NS |
| AS | 1 | 0.08 NS | 2.99 NS | 2.21 NS |
| Estrés * AS | 1 | 13.12 ** | 17.40 ** | 0.28 NS |
| R² | | 80.14 | 42.74 | 0.12 |
| CV | | 0.51 | 0.75 | 122.65 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, ESTRÉS = plantas inoculadas después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C). AS= Aplicación de ácido salicílico 1 mM.

Tabla 3.7.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento total (g/planta), porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, podredumbre apical, virósico y descarte total. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 1.

| | Total | Pequeño | Rajado | Deforme | Podredumbre apical | Descarte total |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|----------------|
| FV | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 0.03 NS | 0.08 NS | 1.85 NS | 2.13 NS | 0.14 NS | 1.72 NS |
| AS | 5.91 * | 0.00 NS | 1.13 NS | 1.45 NS | 0.01 NS | 2.82 NS |
| Estrés*AS | 0.28 NS | 0.50 NS | 2.33 NS | 0.00 NS | 0.91 NS | 0.16 NS |
| VIR | 0.17 NS | 0.61 NS | 0.52 NS | 0.01 NS | 1.62 NS | 0.36 NS |
| Estrés*VIR | 0.43 NS | 0.01NS | 3.48 NS | 1.33 NS | 0.35 NS | 4.99 * |
| AS*VIR | 1.06 NS | 0.13 NS | 3.30 NS | 3.33 NS | 0.75 NS | 0.69 NS |
| R² | 0.34 | 0.12 | 0.44 | 0.45 | 0.23 | 0.37 |
| CV | 25.43 | 36.12 | 20.20 | 78.3 | 145.85 | 13.51 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= 24hs a 40 °C previo a la inoculación; AS=Acido salicílico (1 mM), previo a la inoculación; VIR=Inoculado con una cepa de TSWV.

Tabla 3.7.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento total (g/planta), porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme y descarte total. Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 2.

| | Total | Rajado | Deforme | Descarte total |
|----------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------------|
| FV | F | F | F | F |
| Estrés | 1.71 NS | 2.13 NS | 1.39 NS | 0.62 NS |
| AS | 10.60 ** | 1.45 NS | 0.21 NS | 0.35 NS |
| Estrés*AS | 0.42 NS | 0.00 NS | 1.00 NS | 0.02 NS |
| VIR | 0.31 NS | 0.01 NS | 0.04 NS | 0.02 NS |
| Estrés*VIR | 0.58 NS | 1.33 NS | 0.12 NS | 4.80 * |
| AS*VIR | 1.88 NS | 3.33 NS | 0.14 NS | 0.26 NS |
| R² | 0.22 | 0.12 | 0.07 | 0.18 |
| CV | 43.91 | 52.08 | 313.85 | 46.51 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coefficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= 24hs a 40 °C previo a la inoculación; AS=Acido salicílico (1 mM), previo a la inoculación; VIR=Inoculado con una cepa de TSWV.

Tabla 3.8.1 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (g/planta), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 1.

| | COMERCIAL | CHICO | MEDIANO | GRANDE |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| FV | F | F | F | F |
| Estrés | 2.37 NS | 2.33 NS | 0.01 NS | 1.86 NS |
| AS | 0.96 NS | 0.33 NS | 1.96 NS | 2.62 NS |
| Estrés*AS | 0.03 NS | 1.08 NS | 0.03 NS | 1.50 NS |
| VIR | 0.09 NS | 1.73 NS | 0.37 NS | 0.76 NS |
| Estrés*VIR | 3.02 NS | 0.61 NS | 0.04 NS | 0.39 NS |
| AS*VIR | 0.26 NS | 1.52 NS | 0.12 NS | 1.24 NS |
| R² | 0.24 | 0.33 | 0.18 | 0.42 |
| CV | 60.92 | 76.22 | 167.49 | 83.01 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coefficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= 24hs a 40 °C previo a la inoculación; AS=Acido salicílico (1 mM), previo a la inoculación; VIR=Inoculado con una cepa de TSWV.

Tabla 3.8.2 Efecto del estrés térmico y el ácido salicílico antes de la inoculación. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (g/planta), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 - 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Gol resistente a TSWV. Repetición 2.

| | COMERCIAL | CHICO | MEDIANO | GRANDE |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| FV | F | F | F | F |
| Estrés | 0.02 NS | 5.29 * | 3.39 NS | 1.32 NS |
| AS | 5.73 * | 0.53 NS | 0.06 NS | 1.32 NS |
| Estrés*AS | 0.05 NS | 1.82 NS | 0.43 NS | 4.30 * |
| VIR | 2.28 NS | 2.90 NS | 1.02 NS | 4.30 * |
| Estrés*VIR | 2.55 NS | 0.95 NS | 0.24 NS | 1.32 NS |
| AS*VIR | 1.36 NS | 0.14 NS | 0.01 NS | 1.32 NS |
| R² | 0.21 | 0.20 | 0.12 | 0.24 |
| CV | 102.45 | 33.68 | 214.32 | 458.19 |

R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= 24hs a 40 °C previo a la inoculación; AS=Acido salicílico (1 mM), previo a la inoculación; VIR=Inoculado con una cepa de TSWV.

Tabla 3.9.1 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra” al final del cultivo en invernadero bajo condiciones de inóculo natural.

| | | 1999 | 2000 | 2004 | 2005 |
|----------------------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| FV | gl | F | F | F | F |
| Híbrido | 1 | 23.52 ** | 14.95 ** | 26.39 ** | 19.02 ** |
| AS | 1 | 11.99 ** | 0.72 NS | 0.44 NS | 0.54 NS |
| Híbrido * AS | 1 | 11.99 ** | 0.72 NS | 4.17 * | 0.32 NS |
| Rep | 3 | 4.30 NS | 0.89 NS | 2.88 * | 1.04 NS |
| R² | | 0.82 | 0.68 | 0.71 | 0.34 |
| CV | | 19.03 | 28.85 | 23.48 | 33.99 |

** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, AS= Aplicación semanal de ácido salicílico 1 mM desde el transplante hasta los 45 días del mismo.

Tabla 3.9.2 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para porcentaje de plantas ELISA + para TSWV y TCSV/GRSV a los 60 días del transplante.

| | | 2004 | | 2005 | |
|----------------|----|---------|-----------|---------|-----------|
| | | TSWV | GRSV/TCSV | TSWV | GRSV/TCSV |
| FV | gl | F | F | F | F |
| Híbrido | 1 | 0.50 NS | 5.56 * | 0.44 NS | 5.78 * |
| AS | 1 | 0.50 NS | 0.17 NS | 0.11 NS | 1.34 NS |
| Híbrido * AS | 1 | 0.50 NS | 0.03 NS | 2.23 NS | 0.02 NS |
| Rep | 3 | 0.58 NS | 0.73 NS | 1.01 NS | 1.15 NS |
| R ² | | 0.21 | 0.34 | 0.16 | 0.22 |
| CV | | 25.47 | 31.31 | 29.98 | 28.05 |
| Media general | | 21.62 | 24.45 | 22.32 | 24.30 |

** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, AS= Aplicación semanal de ácido salicílico 1 mM desde el transplante hasta los 45 días del mismo.

Tabla 3.10 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables rendimiento total porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, podredumbre apical, virósico, polilla del tomate y descarte total. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| | Total | Pequeño | Rajado | Deforme | Pod apical | Virósico | Polilla | Descarte total |
|----------------|---------|---------|-----------|---------|------------|----------|----------|----------------|
| FV | F | F | F | F | F | F | F | F |
| AS | 2.54 NS | 1.20 NS | 0.01 NS | 0.14 NS | 0.95 NS | 5.73 * | 0.19 NS | 0.65 NS |
| Campaña | 8.86 * | 1.15 NS | 111.46 ** | 1.01 NS | 2.04 NS | 11.33 * | 32.12 ** | 2.46 NS |
| Rep (Campaña) | 0.86 NS | 2.72 NS | 1.23 NS | 0.58 NS | 0.62 NS | 0.95 NS | 1.16 NS | 0.36 NS |
| R ² | 0.74 | 0.76 | 0.95 | 0.44 | 0.56 | 0.81 | 0.87 | 0.49 |
| CV | 34.82 | 44.04 | 37.53 | 80.24 | 259.59 | 80.61 | 70.06 | 37.59 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. AS= Aplicación semanal de ácido salicílico (1 mM) hasta 45 días del transplante.

Tabla 3.11 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (kg/m²), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Bonanza susceptible a TSWV.

| | COMERCIAL | CHICO | MEDIANO | GRANDE |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| FV | F | F | F | F |
| AS | 7.94 * | 1.37 NS | 0.00 NS | 0.52 NS |
| Campaña | 4.43 NS | 4.33 NS | 0.73 NS | 4.17 NS |
| Rep (Campaña) | 2.08 NS | 1.20 NS | 0.30 NS | 0.62 NS |
| R² | 0.81 | 0.68 | 0.34 | 0.59 |
| CV | 26.68 | 34.83 | 30.04 | 40.59 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. AS= Aplicación semanal de ácido salicílico (1 mM) hasta 45 días del transplante.

Tabla 3.12 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables rendimiento total porcentajes de descarte por pequeño (fruto < 50 g), rajado, deforme, polilla del tomate y descarte total. Híbrido Gol resistente a TSWV.

| | Total | Pequeño | Rajado | Deforme | Polilla | Descarte total |
|----------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| FV | F | F | F | F | F | F |
| AS | 4.09 NS | 15.94 ** | 2.58 NS | 0.00 NS | 0.10 NS | 1.01 NS |
| Campaña | 3.46 NS | 2.55 NS | 6.63 * | 1.28 NS | 38.19 ** | 4.90 NS |
| Rep (Campaña) | 2.37 NS | 2.64 NS | 2.27 NS | 0.52 NS | 1.46 NS | 0.47 NS |
| R² | 0.68 | 0.80 | 0.71 | 0.35 | 0.85 | 0.49 |
| CV | 23.22 | 33.71 | 40.43 | 52.87 | 64.39 | 33.94 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. AS= Aplicación semanal de ácido salicílico (1 mM) hasta 45 días del transplante.

Tabla 3.13 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables rendimiento comercial (kg/m²), porcentajes de fruto chico (50 - 150 g), mediano (150 – 250 g) y grande (> 250 g). Híbrido Gol resistente a TSWV.

| | COMERCIAL | CHICO | MEDIANO | GRANDE |
|----------------|-----------|---------|---------|---------|
| FV | F | F | F | F |
| AS | 2.82 NS | 0.00 NS | 0.02 NS | 0.00 NS |
| Campaña | 0.11 NS | 1.17 NS | 0.21 NS | 0.03 NS |
| Rep (Campaña) | 1.22 NS | 0.64 NS | 0.46 NS | 0.73 NS |
| R ² | 0.50 | 0.32 | 0.23 | 0.27 |
| CV | 22.84 | 32.20 | 36.15 | 34.50 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coefficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. AS= Aplicación semanal de ácido salicílico (1 mM) hasta 45 días del transplante.

Tabla 3.14 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural. Análisis de variancia para las variables número de agallas/g raíz, porcentaje de raíces con síntomas de podredumbres radiculares y materia seca raíz.

| | AGALLAS | PODREDUMBRES RADICULARES | MATERIA SECA RAIZ |
|----------------|---------|--------------------------|-------------------|
| FV | F | F | F |
| HIBRIDO | 2.55 NS | 0.09 NS | 0.01 NS |
| AS | 0.26 NS | 3.33 NS | 1.40 NS |
| HIBRIDO * AS | 0.25 NS | 5.54 * | 2.72 NS |
| REP | 4.65 * | 0.88 NS | 6.33 * |
| R ² | 0.03 | 0.04 | 0.034 |
| CV | 52.23 | 74.95 | 26.20 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coefficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. AS= Aplicación semanal de ácido salicílico (1 mM) hasta 45 días del transplante.

Tabla 3.15 Aplicaciones de ácido salicílico bajo condiciones de inóculo natural en plantas sometidas al estrés térmico antes del transplante. Análisis de variancia para las variables rendimiento total y comercial (kg/m²) y porcentaje de plantas con síntomas de “peste negra”. Híbridos Bonanza y Gol.

| | BONANZA | | | GOL | |
|----------------|---------|-----------|---------------|---------|-----------|
| | Total | Comercial | “Peste negra” | Total | Comercial |
| FV | F | F | F | F | F |
| Estrés | 0.04 NS | 1.31 NS | 2.49 NS | 0.19 NS | 0.09 NS |
| AS | 1.44 NS | 0.11 NS | 22.32 * | 6.32 NS | 7.30 NS |
| Estrés * AS | 0.93 NS | 0.01 NS | 0.48 NS | 3.52 NS | 0.01 NS |
| Rep | 0.36 NS | 0.00 NS | 6.03 NS | 19.81 * | 4.16 NS |
| R ² | 0.48 | 0.32 | 0.91 | 0.91 | 0.88 |
| CV | 40.09 | 42.60 | 39.21 | 13.70 | 12.13 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; *=significativo con P < 0.05; **= significativo con P<0.01. Estrés= Plantas sometidas a estrés térmico (24 hs a 40 °C) antes del transplante; AS= Aplicación semanal de ácido salicílico (1 mM) hasta 45 días del transplante.

Tabla 3.16. Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) y efecto del ácido salicílico. Análisis de variancia para severidad de síntomas a los 16, 21 y 28 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas, Silvestre Moneymaker.

| | S 16 | S 21 | S 28 | AREA | DAS |
|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| FV | F | F | F | F | F |
| Estrés | 3.38 * | 1.62 NS | 1.21 NS | 2.13 NS | 3.60 * |
| AS | 0.07 NS | 0.23 NS | 0.29 NS | 0.28 NS | 0.20 NS |
| Estrés*AS | 0.81 NS | 1.68 NS | 1.50 NS | 1.37 NS | 0.41 NS |
| R ² | 0.39 | 0.33 | 0.29 | 0.35 | 0.52 |
| CV | 22.83 | 23.66 | 30.98 | 7.18 | 5.09 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. ESTRÉS = plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), AS= Tratamiento con ácido salicílico (1 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés. S16, S21, S28 = severidad de síntomas a los 16, 21 y 28 días de la inoculación, AREA= área bajo la curva de progreso de la enfermedad, DAS= días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas.

Tabla 3.17 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) y efecto del ácido salicílico. Análisis de variancia para severidad de síntomas a los 14, 26 y 39 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas , Mutante NahG.

| | S 14 | S 26 | S 39 | AREA | DAS |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| FV | F | F | F | F | F |
| Estrés | 0.91 NS | 2.36 NS | 1.92 NS | 1.91 NS | 1.57 NS |
| AS | 0.86 NS | 0.58 NS | 0.58 NS | 0.90 NS | 0.14 NS |
| Estrés*AS | 1.20 NS | 0.52 NS | 0.30 NS | 0.39 NS | 0.39 NS |
| R² | 0.19 | 0.23 | 0.19 | 0.20 | 0.35 |
| CV | 22.71 | 42.29 | 46.16 | 18.93 | 61.17 |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. ESTRÉS = plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), AS= Tratamiento con ácido salicílico (1 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés. S 14, S 26 y S 39 = severidad de síntomas a los días de la inoculación, AREA = área bajo la curva de progreso de la enfermedad,DAS= días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas.

Tabla 4.1 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para Severidad de síntomas a los 13, 11 y 9 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV, repeticiones 1, 2 y 3.

| | Repeticón 1 | | | Repeticón 2 | | | Repeticón 3 | | |
|--------------------------------------|-------------|----------|---------|-------------|---------|----------|-------------|---------|----------|
| | S 13 | AREA | DAS | S 11 | AREA | DAS | S 9 | AREA | DAS |
| FV | F | F | F | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 0.23 NS | 3.14 * | 4.51 ** | 1.94 NS | 5.42 ** | 4.51 ** | 1.76 NS | 2.43 * | 2.23 NS |
| PER | 12.28 ** | 20.05 ** | 2.18 NS | 1.13 NS | 7.31 ** | 0.16 NS | 0.23 NS | 5.66 * | 0.03 NS |
| Estrés*PER | 1.36 NS | 2.75 * | 6.35 ** | 2.27 NS | 3.73 ** | 1.96 NS | 2.60 * | 1.72 NS | 1.96 NS |
| R ² | 0.25 | 0.35 | 0.53 | 0.17 | 0.33 | 0.33 | 0.17 | 0.20 | 0.22 |
| CV | 22.90 | 41.98 | 8.96 | 24.34 | 42.43 | 16.17 | 22.19 | 16.62 | 23.94 |
| CONTRASTES | | | | | | | | | |
| Estrés VS Control | 4.79 * | 10.63 ** | 0.36 NS | 5.53 * | 5.81 * | - | 2.15 NS | 1.00 NS | 7.37 ** |
| Control vs 1 hora después del estrés | 8.64 ** | 10.80 ** | 0.01 NS | 5.33 * | 7.46 ** | - | 3.60 NS | 4.73 * | 4.73 * |
| Estrés en peróxido | 0.13 NS | 1.21 NS | 2.52 NS | 2.84 NS | 5.25 * | 9.24 ** | 2.67 NS | 0.14 NS | 11.42 ** |
| Estrés sin peróxido | 7.36 ** | 12.22 ** | 1.02 NS | 2.69 NS | 1.25 NS | 11.49 ** | 0.19 NS | 1.08 NS | 0.26 NS |
| Peróxido en control | 0.02 NS | 0.34 NS | 1.13 NS | 0.25 NS | 3.81 * | - | 0.94 NS | 0.42 NS | 3.63 NS |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. Estrés = plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), PER = Tratamiento con peróxido (5 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés. S 13, S 11 y S 9 = severidad de síntomas a los 13, 11 y 9 días de la inoculación, AREA = área bajo la curva de progreso de la enfermedad, DAS= días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas.

Tabla 4.2 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para porcentaje de folíolos inoculados (INOC 5) y apicales 5 (API 5) y 15 (API 15) días después de la inoculación. Híbrido Bonanza susceptible a TSWV. Repeticiones 1, 2 y 3.

| | INOC 5 | APIC 5 | APIC 15 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| FV | F | F | F |
| Estrés | 3.32 * | 2.86 * | 2.68 NS |
| PER | 9.51 ** | 0.31 NS | 6.05 * |
| Estrés*PER | 0.91 NS | 1.81 NS | 0.34 NS |
| Rep | 39.48 ** | 45.36 ** | 24.54 ** |
| R² | 0.85 | 0.86 | 0.79 |
| CV | 35.29 | 39.95 | 48.79 |
| CONTRASTES | | | |
| Estrés VS Control | 0.66 NS | 0.10 NS | 1.73 NS |
| Control vs 1 hora después del estrés | 0.19 NS | 0.18 NS | 0.88 NS |
| Estrés en peróxido | 0.22 NS | 0.00 NS | 0.66 NS |
| Estrés sin peróxido | 0.46 NS | 0.20 NS | 1.11 NS |
| Peróxido en control | 0.57 NS | 0.15 NS | 0.20 NS |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo; ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. Estrés = plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), PER = Tratamiento con peróxido (5 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés. INOC 5 = porcentaje de folíolos inoculados ELISA positivos, API 5 y API 15= porcentaje de folíolos apicales ELISA positivos a los 5 y 15 días de la inoculación.

Tabla 4.3.1 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para número de lesiones a los 5 y 15 días de la inoculación, días desde la inoculación hasta la aparición de lesiones locales. Híbrido Gol resistente a TSWV.

| | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | | Repetición 3 | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | L 5 | L 15 | DAS | L 5 | L 15 | DAS | L 5 | L 15 | DAS |
| FV | F | F | F | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 1.44 NS | 1.32 NS | 1.13 NS | 1.57 NS | 1.67 NS | 1.61 NS | 1.03 NS | 4.82 ** | 1.62 NS |
| PER | 4.82 * | 7.31 ** | 0.37 NS | 2.48 NS | 0.93 NS | 2.12 NS | 15.04 ** | 22.62 ** | 23.34 ** |
| Estrés*PER | 1.67 NS | 0.99 NS | 0.84 NS | 0.51 NS | 3.20 * | 1.54 NS | 0.81 NS | 3.42 * | 3.09 * |
| R² | 0.17 | 0.17 | 0.31 | 0.13 | 0.23 | 0.33 | 0.20 | 0.38 | 0.32 |
| CV | 33.67 | 50.69 | 16.35 | 10.95 | 30.06 | 36.09 | 45.61 | 33.24 | 34.06 |
| CONTRASTES | | | | | | | | | |
| Estrés VS Control | 0.30 NS | 2.10 NS | 2.52 NS | 0.06 NS | 4.52 * | 0.71 NS | 0.24 NS | 12.59 ** | 0.39 NS |
| Control vs 1 hora después del estrés | 1.00 NS | 0.04 NS | 0.15 NS | 0.48 NS | 4.07 * | 0.23 NS | 0.07 NS | 3.09 NS | 0.02 NS |
| Estrés en peróxido | 0.73 NS | 3.03 NS | 0.27 NS | 0.00 NS | 13.41 ** | 0.29 NS | 0.80 NS | 13.04 ** | 5.05 * |
| Estrés sin peroxide | 0.01 NS | 0.08 NS | 2.42 NS | 0.12 NS | 0.44 NS | 2.93 NS | 0.04 NS | 1.97 NS | 2.13 NS |
| Peróxido en control | 2.59 NS | 4.71 * | 1.79 NS | 0.24 NS | 10.10 ** | 0.45 NS | 5.96 * | 12.55 ** | 20.17 ** |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. Estrés = plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), PER = Tratamiento con peróxido (5 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés. L 5 y L 15= lesiones locales a los 5 y 15 días de la inoculación, DAS= días hasta aparición de síntomas.

Tabla 4.3.2 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para diámetro de lesiones a los 5, 10 y 15 días de la inoculación. Híbrido Gol resistente a TSWV.

| | Repetición 1 | | | Repetición 2 | | | Repetición 3 | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | D 5 | D 10 | D 15 | D 5 | D 10 | D 15 | D 5 | D 10 | D 15 |
| FV | F | F | F | F | F | F | F | F | F |
| Estrés | 4.82 * | 6.95 ** | 4.23 * | 0.79 NS | 13.44 ** | 3.14 * | 5.17 ** | 3.85 ** | 3.81 ** |
| PER | 2.67 NS | 0.91 NS | 1.19 NS | 0.72 NS | 0.99 NS | 2.48 NS | 1.75 NS | 0.00 NS | 10.02 ** |
| Estrés*PER | - | 2.32 NS | 1.93 NS | 0.33 NS | 6.00 ** | 1.30 NS | 2.30 NS | 7.02 ** | 1.76 NS |
| R² | 0.84 | 0.75 | 0.57 | 0.37 | 0.77 | 0.53 | 0.58 | 0.37 | 0.26 |
| CV | 26.69 | 41.92 | 43.63 | 40.17 | 26.25 | 44.53 | 25.57 | 28.10 | 32.17 |
| CONTRASTES | | | | | | | | | |
| Estrés VS Control | - | 0.10 NS | 0.03 NS | - | - | 0.02 NS | - | - | 10.2 ** |
| Control vs 1 hora después del estrés | - | 0.30 NS | 0.22 NS | - | - | 6.86 * | - | - | 1.87 NS |
| Estrés en peróxido | - | 3.11 NS | 1.43 NS | - | - | 1.51 NS | - | - | 12.37 ** |
| Estrés sin peróxido | - | 0.38 NS | 0.97 NS | - | 9.00 ** | 2.02 NS | - | 3.33 NS | 0.88 NS |
| Peróxido en control | - | 0.67 NS | 0.64 NS | 1.56 NS | 0.00 NS | 8.56 ** | 9.26 ** | - | 9.59 ** |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. Estrés = plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), PER = Tratamiento con peróxido (5 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés, D 5, D 10 y D 15 = diámetro de lesiones a los 5, 10 y 15 días de la inoculación.

Tabla 4.4 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para severidad de síntomas a los 13, 20 y 36 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Silvestre Motelle.

| | S 13 | S 20 | S 36 | AREA | DAS |
|--------------------------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| FV | F | F | F | F | F |
| Estrés | 1.69 NS | 0.90 NS | 1.85 NS | 1.47 NS | 1.79 NS |
| PER | 1.32 NS | 5.57 * | 3.76 * | 3.76 * | 6.69 * |
| Estrés*PER | 0.96 NS | 0.32 NS | 0.34 NS | 0.34 NS | 0.80 NS |
| R ² | 0.12 | 0.11 | 0.13 | 0.12 | 0.25 |
| CV | 12.34 | 33.17 | 38.51 | 13.06 | 19.70 |
| CONTRASTES | | | | | |
| Estrés vs Control | 2.72 NS | 3.43 NS | 3.61 NS | 4.86 * | 5.05 * |
| Control vs 1 hora después del estrés | 3.55 NS | 2.73 NS | 4.85 * | 4.43 ** | 5.13 * |
| Estrés en peróxido | 0.57 NS | 1.08 NS | 1.97 NS | 1.67 NS | 1.67 NS |
| Estrés sin peróxido | 2.49 NS | 2.49 NS | 1.65 NS | 3.34 NS | 3.75 NS |
| Peróxido en control | 0.00 NS | 0.53 NS | 0.92 NS | 0.45 NS | 0.83 NS |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. ESTRÉS = plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), PER = Tratamiento con peróxido (5 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés, S 13, S 20 y S 36 = severidad de síntomas sistémicos a los 13, 20 y 36 días de la inoculación, AREA = área bajo la curva de progreso de la enfermedad, DAS= días hasta aparición de síntomas.

Tabla 4.5 Duración del efecto de predisposición causado por estrés térmico (40°C) en plantas con y sin aplicación exógena de peróxido. Análisis de variancia para severidad de síntomas a los 10, 20 y 30 días de la inoculación, área bajo la curva de progreso de la enfermedad, días desde la inoculación hasta la aparición de síntomas. Mutante NADPH oxidasa.

| FV | S 10 | S 20 | S 30 | AREA | DAS |
|--------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|---------|
| | F | F | F | F | F |
| Estrés | 2.57 * | 2.44 * | 7.70 ** | 4.24 ** | 0.21 NS |
| PER | 2.63 NS | 0.26 NS | 0.03 NS | 0.79 NS | 0.37 NS |
| Estrés*PER | 2.39 NS | 3.45 * | 5.57 ** | 4.18 ** | 1.20 NS |
| R ² | 0.20 | 0.21 | 0.37 | 0.28 | 0.08 |
| CV | 17.97 | 30.00 | 27.66 | 9.63 | 42.38 |
| MEDIA | 1.10 | 1.32 | 1.70 | 34.86 | 20.27 |
| CONTRASTES | | | | | |
| Estrés vs Control | 3.00 NS | 5.64 * | 13.72 ** | 7.82 ** | 0.48 NS |
| Control vs 1 hora después del estrés | 8.58 ** | 8.10 ** | 23.49 ** | 13.98 ** | 0.75 NS |
| Estrés en peróxido | 5.61 * | 5.39 * | 11.65 ** | 8.13 ** | 0.91 NS |
| Estrés sin peroxide | 0.01 NS | 1.08 NS | 3.33 NS | 1.22 NS | 0.01 NS |
| Peróxido en control | 0.52 NS | 0.34 NS | 0.87 NS | 0.50 NS | 0.81 NS |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coeficiente de variación; ns=no significativo, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. ESTRÉS = plantas inoculadas 1, 4, 8 y 24 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), PER = Tratamiento con peróxido (5 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés. , S 10, S 20 y S 30 = severidad de síntomas sistémicos a los 10, 20 y 30 días de la inoculación, AREA = área bajo la curva de progreso de la enfermedad, DAS= días hasta aparición de síntomas.

Tabla 4.6 Análisis de variancia para actividad SOD (USOD/mg prot) y CAT (mmol H₂O₂/min prot) para una repetición del híbrido susceptible a TSWV (BONANZA) y dos del resistente (GOL 1 y GOL 2). Muestras extraída después de los tratamientos de estrés y antes de inocular.

| | BONANZA | | GOL 1 | | GOL 2 | |
|--|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| FV | SOD | CAT | SOD | CAT | SOD | CAT |
| | F | F | F | F | F | F |
| ESTRÉS | 5.32 ** | 8.98** | 2.04 NS | 6.26 ** | 2.27 NS | 6.61 ** |
| PER | 10.18 ** | 2.63 NS | 2.32 NS | 5.55 * | 0.89 NS | 7.74 ** |
| ESTRES*PER | 1.53 NS | 1.80 NS | 0.51 NS | 3.09 * | 5.58 ** | 13.65 ** |
| R² | 0.55 | 0.55 | 0.24 | 0.52 | 0.51 | 0.74 |
| CV | 33.15 | 27.76 | 35.74 | 25.26 | 20.99 | 25.81 |
| CONTRASTES | | | | | | |
| Estrés vs Control | 6.24 * | 18.07 ** | 2.05 NS | 1.63 NS | 0.04 NS | 1.36 NS |
| Control vs 1 hora después del estrés | 0.25 NS | 25.46 ** | 0.06 NS | 9.09 ** | - | - |
| Estrés en peróxido | 5.04 * | 12.26 ** | 2.91 NS | 4.12 * | 0.48 NS | 7.80 ** |
| Estrés sin peróxido | 1.65 NS | 6.32 * | 0.10 NS | 0.05 NS | - | - |
| Peróxido en control | 4.85 * | 0.02 NS | 0.04 NS | 0.14 NS | 0.89 NS | 0.55 NS |
| Peróxido en 8 horas después del estrés | 1.33 NS | 1.72 NS | 2.56 NS | 0.28 NS | 0.61 NS | 2.33 NS |
| Peróxido en 4 horas después del estrés | 0.06 NS | 1.40 NS | 1.18 NS | 15.16 ** | 4.06 * | 38.23 ** |
| Peróxido en 1 hora después del estrés | 0.17 NS | 4.47 * | 0.03 NS | 2.24 NS | 0.09 NS | 5.99 * |
| Peróxido en 24 horas después del estrés | 10.48 ** | 1.69 NS | 0.57 NS | 0.08 NS | - | - |

FV= Fuente de variación, gl= grados de libertad, R²=coeficiente de determinación; CV=Coefficiente de variación; ns=no significativo, ** = Significativo con P<0.01, * = Significativo con P<0.05, NS= no significativo, - No se puede analizar por no ser suficientes los grados de libertad. ESTRÉS = plantas inoculadas 1 hora después de finalizado el tratamiento de estrés (24 hs a 40 °C), PER = Tratamiento con peróxido (5 mM) asperjado a las plantas inmediatamente después de los tratamientos de estrés.