

CAPÍTULO 6

INTERVENCIÓN DE LOS COMPUESTOS SECUNDARIOS EN LAS INTERACCIONES BIOLÓGICAS

María Cecilia Arango

1. Definición de Bioquímica Ecológica

La Bioquímica ecológica es una ciencia que surgió del acercamiento de dos disciplinas, la Bioquímica y la Ecología. Se encarga de estudiar las bases moleculares de las interacciones entre microorganismos, plantas y animales y su adaptación al medio ambiente. Su contenido abarca también los fundamentos a nivel molecular de las estructuras de control que permiten a los seres vivos censar los cambios ambientales y modificar su morfología, fisiología y metabolismo para poder responder a dichos cambios. Una parte de esta rama de la ciencia estudia las rutas metabólicas que las plantas utilizan para sintetizar compuestos químicos como mecanismos de defensa contra la herbivoría.

Los metabolitos secundarios están implicados en la mayoría de las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, desempeñando una gran variedad de funciones. Muchos de ellos cumplen roles de defensa contra depredadores y patógenos y pueden actuar como agentes alelopáticos. Otra función que se les atribuye es la atracción de polinizadores y dispersores de semillas. Participan también ayudando a las plantas a sobrevivir en situaciones de estrés hídrico, salino o por contaminación con metales pesados, como así también protegen a las plantas de la radiación ultravioleta; incluso pueden actuar como señales moleculares en las relaciones simbióticas de las plantas con diversas variedades de hongos y bacterias del suelo.

Las plantas, a lo largo de la evolución, han desarrollado estrategias complejas para hacer frente a situaciones de estrés biótico y abiótico, debido a que no

presentan un sistema inmunológico como el que poseen los animales superiores y a su imposibilidad de trasladarse y escapar de las situaciones adversas. Los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas presentan una gran diversidad de estructuras químicas, lo que comprueba en parte las diferentes estrategias de adaptación de las plantas (Harborne, 1993).

Se han observado diferentes perfiles metabólicos entre especies, entre miembros de una misma población y entre diferentes órganos de una misma planta. Debido al elevado costo energético que implica su biosíntesis, las plantas encauzan su metabolismo hacia un tipo u otro de compuestos secundarios dependiendo de los recursos disponibles (Bryant *et al.*, 1992).

El estudio de la Bioquímica ecológica puede constituir una base para el desarrollo de tecnologías tendientes a corregir los desequilibrios ambientales provocados por el uso indiscriminado de pesticidas (insecticidas, herbicidas y fungicidas) utilizados con el objetivo de incrementar el rendimiento de los cultivos, pero que afectan en forma negativa al medioambiente.

2. Interacciones planta-microorganismos patógenos mediadas por compuestos secundarios

Cuando un agente patógeno ataca a una planta se generan interacciones entre ambos que se traducen en una respuesta de defensa en la planta, activándose la transcripción de genes que codifican proteínas defensivas necesarias para impedir su invasión. La interacción entre ambos puede ser de tipo compatible o incompatible. Se dice que la interacción es compatible cuando el patógeno es virulento y logra invadir la planta degradando componentes de la pared celular de las células epidérmicas, hidrolizando ceras, degradando sustancias tóxicas presentes en el vegetal o segregando toxinas. Cuando el patógeno no logra invadir la planta, la interacción es de tipo incompatible; en este caso, la falta de virulencia del invasor se debe generalmente a la imposibilidad de superar las barreras estructurales y químicas que ofrece la planta o a que ésta activa una

serie de mecanismos de defensa con el objetivo de detener, morigerar o contrarrestar la infección.

Como se ha mencionado en Capítulos anteriores, las plantas pueden tener mecanismos de defensa constitutivos o inducidos. La resistencia inducida es una forma de defensa activa, que involucra la expresión diferencial de genes junto con cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de un proceso de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno, mientras que la defensa constitutiva o preformada, constituye un mecanismo de tipo pasivo de resistencia contra los patógenos.

2.1. Mecanismos de defensa

2.1.1. Mecanismos de defensa constitutivos

Los mecanismos de resistencia constitutiva se suelen dividir en estructurales y químicos. Los *estructurales* hacen referencia al desarrollo de diferentes estructuras ubicadas principalmente en la superficie de los tejidos o formando parte de la pared celular, cuya misión es actuar de barrera inicial a la propagación de microorganismos patógenos dentro de la planta, a corto plazo. Por ejemplo, las fibras de celulosa que forman la pared celular constituyen una barrera física que impide la entrada de insectos y microorganismos patógenos. Otro constituyente de la pared, la lignina, contribuye a aumentar la resistencia. La presencia de cutícula con depósitos de ceras y cutina, particularmente gruesa en las plantas xerófitas, impide la pérdida de agua de la planta y evita la entrada de hongos y bacterias; también en otras especies dificulta la formación de películas de agua en la superficie foliar después de las lluvias, lo que no permite la germinación de las esporas de hongos fitopatógenos. La presencia de pelos o tricomas foliares, lenticelas y las diferentes estructuras de estomas son otros ejemplos de mecanismos de resistencia de tipo estructural. Estas barreras físicas pueden estar presentes sólo en determinadas etapas del desarrollo de la planta o en todo su ciclo biológico.

Las *defensas constitutivas químicas* se refieren a la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Se distribuyen estratégicamente en los diferentes tejidos, localizándose generalmente en tejidos superficiales de tallos, hojas y frutos. A nivel celular se los suele encontrar en vacuolas o en glándulas especializadas desde donde pueden ser liberados al citoplasma, o extracelularmente como resinas o material de la pared celular. Se han podido observar mayores concentraciones de dichos compuestos en las yemas en crecimiento de arbustos, en hojas jóvenes, órganos reproductores y de dispersión y, en general, en los tejidos nuevos, comparado con los tejidos viejos (Rhoades, 1979). Algunos autores han denominado *fitoanticipinas* a aquellos metabolitos secundarios que se encuentran en forma constitutiva (van Etten *et al.*, 1995). Estos compuestos pueden resultar tóxicos también para la planta que los produce, es por este motivo que las rutas biosintéticas, sus precursores y el almacenamiento de los metabolitos secundarios suele ocurrir en distintos compartimentos celulares. Por ejemplo, el sorgo (*Sorghum spp.*) y la yuca o mandioca (*Manihot esculenta*), presentan glicósidos cianogénicos en las vacuolas mientras que las enzimas que hidrolizan estos compuestos están ubicadas en el citosol. Cuando las hojas de la planta han sufrido un daño, el sustrato se pone en contacto con la enzima liberando HCN en última instancia (Capítulo 3: Figura 9). Algunos herbívoros han desarrollado en el transcurso de su evolución mecanismos para evitar sus efectos tóxicos. El glicósido cianogénico linamarina (Figura 1) se halla presente en *Lotus corniculatus*; como producto de la hidrólisis de este compuesto se libera una cetona y HCN en forma espontánea. El hongo *Stemphyllium loti* que parasita esta especie presenta cierto grado de tolerancia al cianuro. Estos microorganismos poseen la capacidad de degradar el cianuro a formamida (HCONH_2), un compuesto menos tóxico, mediante la acción de la enzima cianuro hidratasa que es inducida en las esporas o micelio del hongo cuando está expuesto a bajas concentraciones de HCN (Powell *et al.*, 1983).

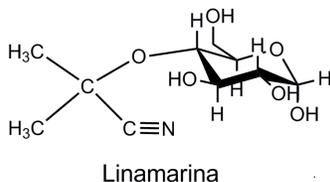


Figura 1. Glicósido cianogénico presente en *Lotus corniculatus*

Muchos fenoles simples y polifenoles (taninos), terpenoides, glicósidos cianogénicos y alcaloides actúan como toxinas impidiendo la invasión de agentes patógenos. La mayoría de los compuestos fenólicos y alcaloides se almacenan en las vacuolas. Algunos de ellos se encuentran al estado de glicósidos para facilitar su solubilidad. Los terpenos se almacenan generalmente en estructuras especializadas como tricomas y pelos glandulares. Entre los terpenoides con actividad antimicrobiana encontramos al mentol (monoterpeno), los sesquiterpenos risitina y lubimina de la papa (*Solanum tuberosum* L.), el capsidiol en pimiento (*Capsicum annum* L.), el triterpeno cucurbitacina de las raíces de pepino (*Cucumis sativus* L.) con actividad nematocida (Figura 2).

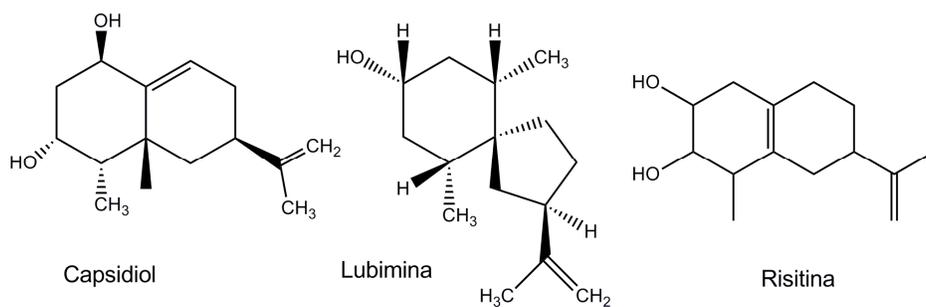


Figura 2. Terpenoides con actividad antimicrobiana

Las coníferas sintetizan oleorresinas viscosas (mezcla de monoterpenos cíclicos volátiles y ácidos diterpénicos) como defensa contra ciertos tipos de escarabajos y sus hongos asociados (Leicach, 2006). Los terpenos volátiles expuestos al aire se oxidan y polimerizan formando masas cristalinas que sellan heridas impidiendo la entrada de patógenos. Los compuestos químicos que se encuentran en forma constitutiva pueden incrementar su nivel ante

situaciones adversas. Por ejemplo, los alcaloides quinolizidínicos esparteína y lupamina (Figura 3) presentes en especies del género *Lupinus* actúan inhibiendo el crecimiento de hongos, bacterias y virus aumentando su síntesis en respuesta a heridas (De la Vega *et al.*, 1996).

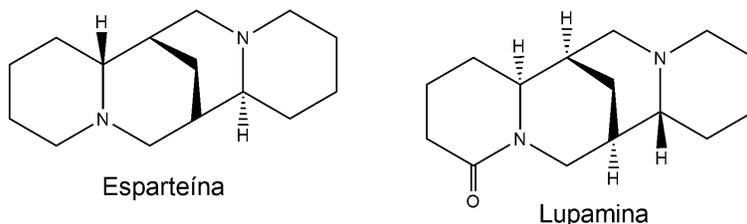


Figura 3. Alcaloides con actividad microbiana

Los metabolitos secundarios, además de actuar como una barrera inicial para la propagación de patógenos potenciales, pueden ejercer una presión selectiva sobre las plantas y los patógenos, que con el transcurso del tiempo pueden desarrollar mecanismos de resistencia.

La canela (*Cinnamomum zeylanicum*), presenta diferentes metabolitos antifúngicos en distintos órganos de la planta. La corteza de su tallo produce altas concentraciones de aldehído cinámico; en sus hojas predomina el eugenol y en las células corticales de sus raíces prevalece el alcanfor (Senanayake *et al.*, 1978) (Figura 4).

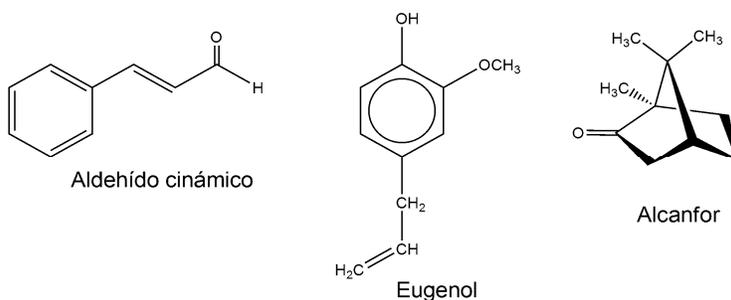


Figura 4. Metabolitos secundarios con actividad antifúngica presentes en canela

En la avena (*Avena sativa* L.) se concentra la producción de avenacina (saponina terpénica esteroidal) en la capa de células de la epidermis de raíces, compuesto que actúa sobre el hongo *Gaeumannomyces graminis* (Mansfield, 1983). En tomate se encuentra otra saponina, la alfa tomatidina (saponina de

origen esterooidal alcaloide) en toda la planta, pero en mayor concentración en tejidos jóvenes y frutos verdes (Figura 5).

Algunos alcaloides tóxicos se activan luego de la ingestión por el herbívoro o cuando se acumulan en una concentración que sobrepasa un umbral de toxicidad.

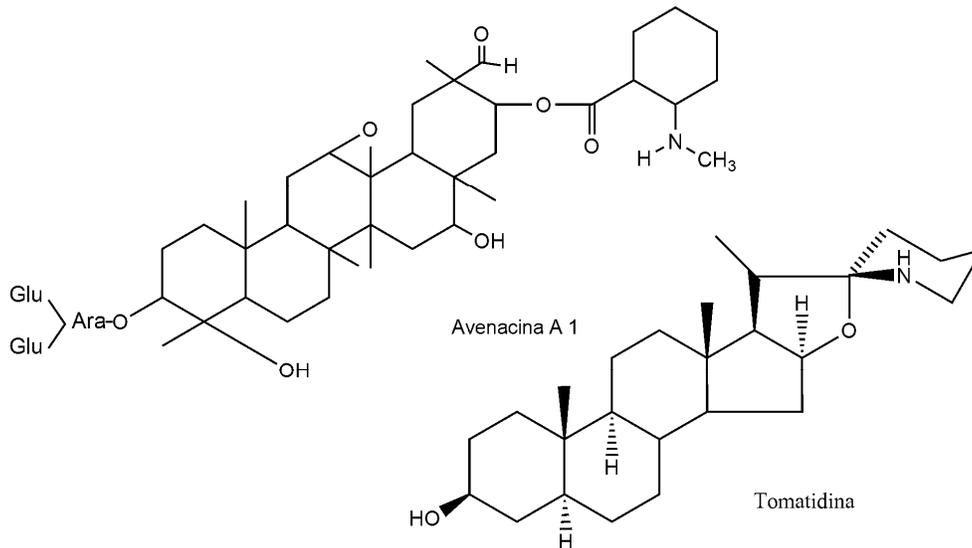


Figura 5. Saponinas con actividad antifúngica: avenacina A-1 presente en avena y tomatidina presente en tomate

2.1.2. Mecanismos de defensa inducidos

A pesar de las barreras naturales que ofrecen resistencia, algunos patógenos pueden entrar a las plantas por aperturas naturales, como por ejemplo las lenticelas de los tubérculos de la papa, a través de la cutícula cuando ésta ha sido dañada mecánicamente o atravesando la pared celular. En tales circunstancias, la planta puede activar mecanismos de defensa con el fin de detener la infección. Estos mecanismos constituyen las defensas inducibles, que se promueven en los organismos como respuesta al ataque de herbívoros y agentes patógenos (Collinge *et al.*, 1994) con el objetivo de conferir inmunidad o cierto grado de resistencia frente a futuros ataques que implican formación y cambios en las estructuras morfológicas y variaciones en la composición y/o concentración de compuestos químicos.

Las plantas con mecanismos de defensa inducibles presentan sistemas de percepción del invasor a partir de los cuales se activan genes implicados en la respuesta defensiva (teoría gen por gen). Este mecanismo es equivalente al sistema inmunitario animal “antígeno-anticuerpo”.

Los productos naturales que actúan como mecanismos de defensa inducibles son relativamente pocos y presentan una distribución restringida desde el punto de vista taxonómico. Estos compuestos pueden ser proteínas, glúcidos o metabolitos secundarios. Los metabolitos inductores de defensa pueden no ser específicos como es el caso de la quitina, que conforma la pared celular de los hongos, y es capaz de inducir la expresión de genes de defensa en las plantas ante un ataque fúngico. Este tipo de defensas se activan en general como respuesta a daños en los tejidos vegetales provocados por agentes patógenos o condiciones ambientales adversas.

Por otro lado, la inducción de los mecanismos de defensa puede ser de tipo específica, donde la planta reconoce al patógeno. Este mecanismo parece estar mediado por genes presentes en el patógeno y en la planta.

Los genes implicados en la respuesta defensiva codifican enzimas relacionadas con la formación de componentes de la pared celular, principalmente lignina, calosa y proteínas ricas en hidroxiprolina; enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas; la fosforilación y desfosforilación de proteínas; inhibidores de proteasas y la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP). Estas últimas se acumulan durante y después de una infección. Se caracterizan por ser de bajo peso molecular, resistentes a proteasas y de localización extracelular (van Loon y van Kammen, 1970). Las PRP se identificaron por primera vez en plantas de tabaco infectadas por el virus del mosaico del tabaco. La expresión de estas proteínas también puede ser inducida por reguladores de crecimiento como el etileno, ácido abscísico y ácido indol acético (AIA) (Figura 6) como por factores ambientales adversos. Incluso se han detectado en tejidos sanos.

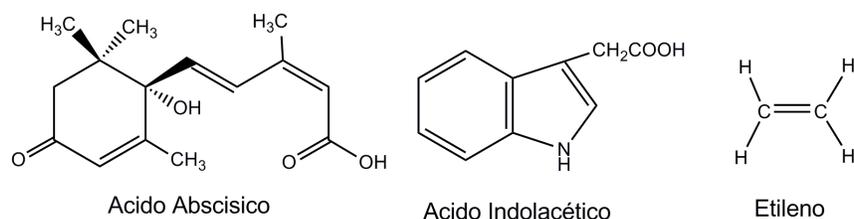


Figura 6. *Hormonas vegetales implicadas en reacciones de defensa inducibles*

La lignina, si bien es un componente presente en las paredes celulares de varias especies, también se suele acumular en grandes cantidades en tejidos atacados por patógenos. La síntesis de lignina deriva del metabolismo de los fenilpropanoides y está regulada por la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa) (Capítulo 4).

Las defensas en los tejidos vegetales son también inducidas por componentes de la pared celular de ciertos hongos producidos por la actividad de enzimas hidrolíticas del vegetal.

Entre los diversos procesos metabólicos desencadenados como respuesta a la inducción se encuentra también la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) como el radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); estas especies inducen procesos oxidativos que aumentan el daño, como es el caso de la peroxidación de lípidos de membrana, la inhibición de enzimas y la ocurrencia de daños a nivel de los ácidos nucleicos.

Con el objetivo de regular los niveles excesivos de compuestos tóxicos y mantener el estado de óxido-reducción de la célula vegetal, se puede activar la síntesis de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa y catalasa y de metabolitos secundarios con actividad antioxidante como el ácido ascórbico, α -tocoferol, antocianinas, carotenoides y betalainas.

Como elementos de señalización volátiles se ha determinado también el aumento en la concentración de hormonas, que cumplen con la función de transmisión de la información en la planta y también entre plantas vecinas. El ácido jasmónico (AJ), el ácido salicílico (AS) y sus ésteres metílicos (Figura 7) y el etileno (Figura 6) son las más reconocidas entre los mecanismos de defensa.

Estas hormonas junto con la producción de EROs regulan la expresión de determinados genes. Por ejemplo el AJ modula la síntesis de proteínas de la pared celular y de enzimas involucradas en el metabolismo secundario como acetilCoA carboxilasa, chalcona sintasa, PAL y polifenoloxidasas. La emisión de etileno por parte de los tejidos dañados activa genes defensivos en tejidos sanos distantes a la zona dañada o de plantas alejadas que podrían estar expuestas al mismo patógeno. El mecanismo de señalización del éster metílico del AS (precursor de la aspirina) es similar al del etileno, participando además en interacciones alelopáticas.

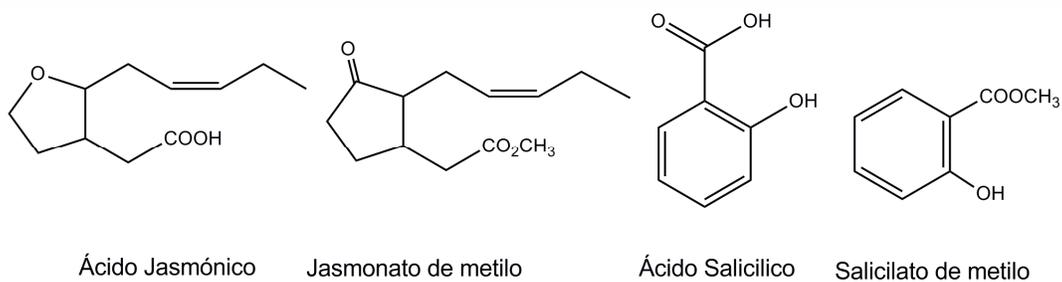


Figura 7. Hormonas naturales implicadas en procesos de defensa

Las EROs pueden provocar toxicidad, aumentando el daño y también pueden actuar como señales de activación de las rutas de defensa.

Los compuestos químicos inducidos están presentes normalmente en bajas concentraciones y suelen incrementarse frente a una infección, como ocurre con el ácido protocatéquico y el catecol (Figura 8) presentes en las cebollas moradas resistentes a la antracnosis, o la cumarina, escopoletina (Figura 9) y el ácido clorogénico (Capítulo 4: Figura 10) en papas infectadas con *Phytophthora infestans* (Mansfield, 1983).

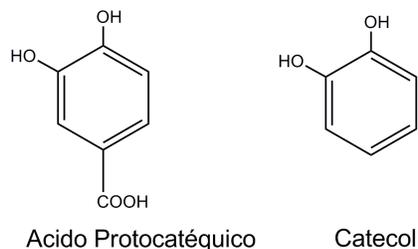
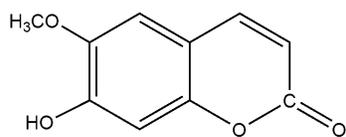


Figura 8. Compuestos fenólicos antimicrobianos presentes en cebollas moradas



Escopoletina

Figura 9. Antifúngico presente en papa

Los flavonoides naringenina y kaempferol (Capítulo 4: Figura 21) del arroz (*Oryza sativa* L.) inhiben el crecimiento del hongo *Xanthomonas oryzae* y la germinación de esporas de *Pyricularia oryzae*. En tomate (*Solanum lycopersicum*) la *p*-cumaroiltiramina y feruloiltiramina (Figura 10) (conjugados de fenilpropanoides con aminas) son inducidos como respuesta a daños. En *Sorgo bicolor* L. se acumula luteolina y apigenina (Capítulo 4: Figura 20) en forma de inclusiones en las células epidérmicas atacadas por el hongo *Colletotrichum graminicola*.

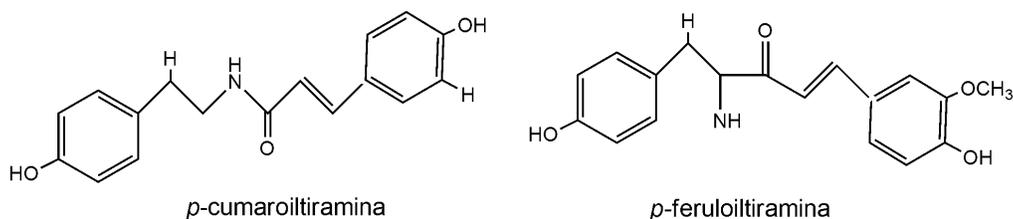


Figura 10. Amidas de ácidos hidroxicinámicos con actividad antifúngica

Los metabolitos inducidos también pueden encontrarse en forma inactiva en plantas sanas y luego de una infección convertirse en productos antifúngicos mediante reacciones bioquímicas que impliquen hidrólisis enzimática, como ocurre en algunas *Poaceae* como la avena y el sorgo que tienen en sus raíces glicósidos cianogénicos. Las plantas, después de ser atacadas por *Gaeumannomyces graminis* liberan HCN por intermedio de enzimas presentes en los tejidos sanos; el HCN es un compuesto perjudicial para el hongo (Grayer y Harborne, 1994). Ocurre lo mismo con los isotiocianatos producidos por la hidrólisis de los glucosinolatos (encontrados en las familias *Brassicaceae*, *Capparidaceae* y *Caricaceae*) por acción de las enzimas hidrolíticas

mirosinasas también llamadas tioglucosidasas (Rask *et al.*, 2000) (Capítulo 3). En este grupo de especies, cuando la planta es dañada tanto por factores físicos como biológicos, la enzima y el sustrato entran en contacto y los glucosilatos son hidrolizados en un compuesto inestable que en condiciones neutras o alcalinas del medio se transforma en un isotiocianato volátil con propiedades antifúngicas.

Otro grupo muy amplio lo constituyen las llamadas fitoalexinas, compuestos de bajo peso molecular que únicamente son sintetizados en respuesta al ataque de un patógeno y que su presencia está restringida al tejido dañado y las células adyacentes.

2.2. Respuesta hipersensible

La respuesta al daño ante la invasión de agentes patógenos puede estar localizada en el lugar de la infección o en sitios alejados al daño.

La respuesta local se denomina *reacción hipersensible* (HR) o muerte celular programada, caracterizada por la muerte rápida de las primeras células infectadas, observándose lesiones necróticas en el sitio de infección, privando al patógeno de nutrientes y soporte mecánico, aislándolo del resto de la planta y restringiendo su expansión. La HR se observa frecuentemente en las interacciones planta-patógeno de tipo incompatible, en la cual la planta presenta genes de resistencia y el patógeno posee genes de avirulencia. Esta respuesta se desarrolla aproximadamente 24 horas después del ataque del patógeno potencial. La HR se asocia también a la expresión de otros mecanismos de defensa como la acumulación de compuestos tóxicos para el patógeno, las fitoalexinas, deposición de lignina y suberina, de proteínas ricas en hidroxiprolina y proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP), las cuales se asocian con el fenómeno denominado resistencia sistémica adquirida o SAR (Ryals *et al.*, 1996).

La HR parece ocurrir como consecuencia de un programa activo y organizado de muerte celular y no como consecuencia del colapso celular pasivo producido

por el ataque del patógeno o la producción de toxinas derivadas de éste (Gilchrist, 1998). En este proceso se activan señales provocadas por la presencia de agentes altamente oxidantes tales como las EROs, entre ellas el anión superóxido y peróxido de hidrógeno y el incremento de óxido nítrico (NO). Luego, para contrarrestar el efecto oxidativo, la planta sintetiza antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa. Como respuesta a estas señales se activa la síntesis de metabolitos secundarios como polifenoles y enzimas PAL, peroxidasa y enzimas hidrolíticas como las quitinasas y β 1,3 glucanasa.

2.3. Resistencia local y resistencia sistémica adquiridas

El ataque local del patógeno capaz de producir lesiones necróticas puede también inducir otras respuestas denominadas resistencia local o sistémica. La respuesta local se conoce como *resistencia local adquirida* (LAR) y la de tipo sistémico *resistencia sistémica adquirida* (SAR).

La resistencia sistémica adquirida es una respuesta de defensa activa, de amplio espectro, que se asocia a una alta expresión de genes que codifican enzimas proteasas (Hammerschmidt, 1999). En la respuesta sistémica el patógeno induce lesiones localizadas similares a las de la HR produciendo una resistencia local (LAR) en el tejido infectado a partir del cual se producen señales que inducen resistencia en el resto de la planta (SAR). La SAR es generalmente efectiva contra hongos, bacterias, virus o nematodos, independientemente del organismo inductor (Ryals *et al.*, 1996).

Durante el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida se reconocen distintos procesos que implican la percepción de elicitores en el sitio de infección, reconocimiento del patógeno por la planta (HR), generación de señales metabólicas transmisibles a través de los tejidos (sistema vascular), amplificación de la señal a distancia, síntesis de AS y expresión de genes SAR (Attaran *et al.*, 2009). El AS es la molécula que ha mostrado mayor evidencia de estar involucrada en este proceso (Mauch-Mani y Métraux, 1998). Por este

motivo, la inducción de SAR generalmente se correlaciona con incrementos en la acumulación de SA, tanto local como sistémicamente (Ordeñana, 2002). La colonización de las raíces por microorganismos de la rizósfera¹ desarrolla un tipo de resistencia particular denominada resistencia sistémica inducida, en la que intervienen el ácido jasmónico y el etileno (Pieterse y van Loon, 1999) (Figura 11).

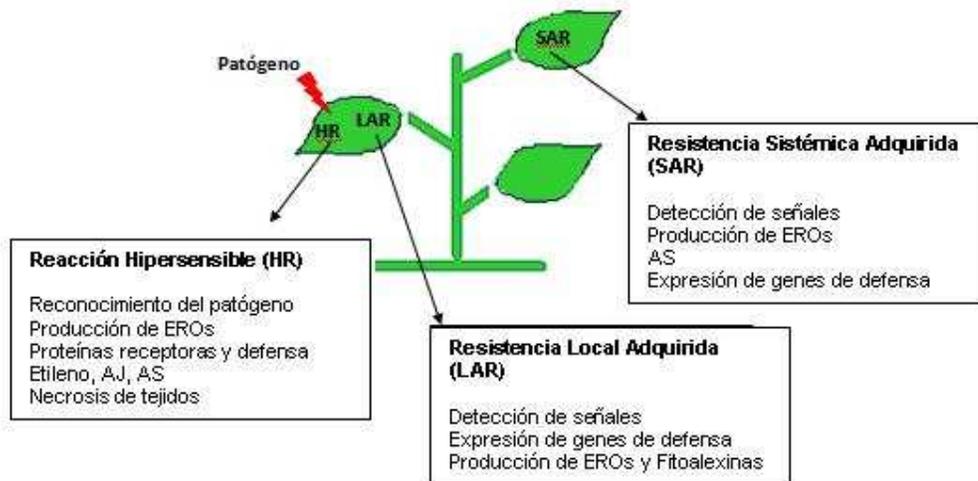


Figura 11. Reacciones de defensa que ocurren en las células infectadas (HR), en tejidos adyacentes (LAR) y en tejidos distantes (SAR)

2.4. Fitoalexinas

Los metabolitos que se sintetizan como respuesta al ataque de hongos fitopatógenos fueron denominados *fitoalexinas* en el año 1941 por Muller y Börger. Más tarde Paxton (1981) las definió como metabolitos secundarios de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos. La primera fitoalexina fue aislada y caracterizada en 1960 por Cruickshank y Perrin, y corresponde a un isoflavonoide pterocarpano, aislado a partir de vainas de arveja (*Pisum sativum*), al que se lo denominó *pisatina*. La activación de la síntesis de estos compuestos en las plantas se produce por acción de factores denominados

“elicitores o inductores” que pueden ser exógenos, producidos por patógenos, agentes químicos y daños mecánicos; o bien pueden ser endógenos, producidos por las plantas en respuesta a determinadas situaciones de estrés.

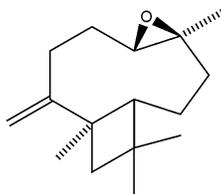
La síntesis de estos compuestos se restringe al lugar de la infección y las células adyacentes, acumulándose en los tejidos necrosados presentando una acción tóxica frente a un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas en plantas. La concentración de estos compuestos es baja antes de una infección y aumenta rápidamente pocas horas luego del ataque del patógeno (Taiz y Zeiger, 2010). Se pudo determinar también que la actividad antifúngica o antimicrobiana puede ser ejercida por un solo compuesto o una mezcla de varios de ellos en distintas concentraciones y proporciones.

Desde el punto de vista químico no existe una división estricta entre las fitoalexinas y los metabolitos antifúngicos y antibacterianos de tipo constitutivos. Se han identificado una gran diversidad de compuestos químicos con función de fitoalexinas de estructura química heterogénea, encontrándose terpenoides (sesquiterpenos, diterpenos), compuestos azufrados, nitrogenados (alcaloides, aminas, amidas), alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos) y fenólicos.

Aún no está bien establecido si la capacidad de sintetizar metabolitos antifúngicos es una propiedad de la mayoría de las plantas o está restringida a determinadas especies y familias botánicas. Con respecto a ello se ha podido determinar que muchas familias botánicas producen fitoalexinas de la misma clase, motivo por el cual se las ha empleado en quimiotaxonomía (Seneviratne y Harbone, 1992). Por ejemplo en las *Fabaceae* numerosas especies sintetizan fitoalexinas de tipo isoflavonoide y en especies de la familia *Solanaceae* se encuentran fitoalexinas de estructura sesquiterpénica.

Las plantas leguminosas del género *Hymenaea* presentan un compuesto antifúngico en las hojas que se denomina óxido de cariofileno (Figura 12), que inhibe al hongo *Pestalotiopsis*. Este compuesto se encuentra formando parte de una mezcla de sesquiterpenos. La risitina, es una lactona sesquiterpénica aislada en papa (*Solanaceae*) también con efectos antifúngicos. Los derivados

del gossipol (Capítulo 5: Figura 30) en *Gossypium hirsutum*, *Malvaceae*, presentan actividad nematostática para *Meloidogyne incognita*.



Óxido de cariofileno

Figura 12. Antifúngico del género *Hymenea*

Por otra parte, se ha determinado en las hojas de *Sequoia sempervirens* (*Cupressaceae*) una mezcla de monoterpenos que en determinadas concentraciones inhiben a los hongos endófitos de esa especie (Espinosa-García y Langenheim, 1991).

Algunos compuestos que forman parte de los aceites esenciales de las plantas aromáticas también pueden tener propiedades antifúngicas.

Entre los compuestos fenólicos encontramos a las cumarinas, derivados del ácido antranílico, estilbenos, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, fenoles simples, antraquinonas, fenilpropanoides (Capítulo 4). Las fitoalexinas más estudiadas son las derivadas del metabolismo de los fenilpropanoides, sintetizados a partir de la fenilalanina. En las leguminosas, se encuentran isoflavonoides con actividad antimicrobiana sintetizados a partir de fenilalanina y la vía del malonato. La pisatina en arveja (*Pisum sativum*), faseolina en poroto (*Phaseolus vulgaris*) y gliceolina I en soja (*Glycine max*) son algunos de ellos (Figura 13). Los ácidos *p*-cumárico y ferúlico (Capítulo 4: Figura 9) en frutos de tomate infectados por *Botrytis cinerea* o en tubérculos de papa infectados con *Phytophthora infestans* sufren incrementos importantes. En las raíces de *Eucalyptus calophylla* infectadas por el hongo *Phytophthora cinnamoni*, se incrementa en forma significativa el contenido de fenólicos solubles seguido de un aumento de lignina y suberina.

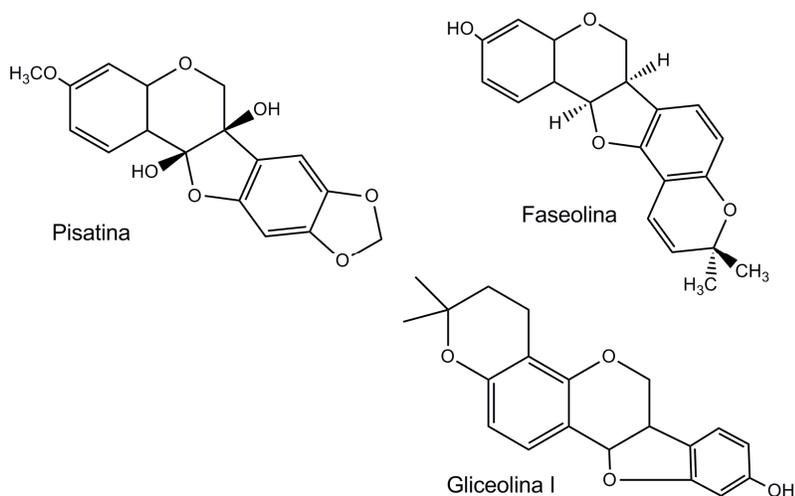


Figura 13. Estructuras de fitoalexinas aisladas de arveja, poroto y soja

La producción de fitoalexinas se asocia a la inducción de genes que codifican enzimas específicas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI) (Figura 14). Se ha señalado la existencia de tres genes para la PAL en poroto, detectándose hasta once isoformas de esta enzima. En poroto, la CHS es codificada por una familia de seis a ocho genes (Ryder *et al.*, 1987). Por ejemplo, se ha identificado a la gliceolina I en células de soja, fitoalexina de naturaleza fenólica sintetizada a partir de la fenilalanina amonio liasa (PAL) la cual constituye un nematocida específico contra larvas de *Meloidogyne incognita* inhibiendo la respiración.

El mecanismo de inducción por el que se producen estas sustancias aún no está totalmente dilucidado, pero se han descrito en varias especies ciertos inductores producidos por los patógenos, que estimulan la transcripción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la planta, el cual codifica la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de las fitoalexinas. De acuerdo a ciertos estudios, parece que la transcripción del ARNm que promueve la síntesis de enzimas necesarias para la producción de fitoalexinas se inicia luego de producido el daño o la invasión del patógeno. Se han identificado receptores específicos en las membranas celulares de soja, los cuales parecen jugar un papel fundamental en la inducción de la acumulación de fitoalexinas en los tejidos infectados por hongos (García-Mateos y Pérez-Leal, 2003).

Se ha observado que numerosos patógenos son capaces de detoxificar fitoalexinas lipófilas transformándolas en compuestos más polares reduciendo su toxicidad (van Etten *et al.*, 1989). Los mecanismos enzimáticos de detoxificación de fitoalexinas implican monooxigenación, desmetilación, reducción, hidratación, oxidación e hidroxilación.

Algunos compuestos que actúan como fitoalexinas se han logrado aislar mediante la técnica de cultivo *in vitro* para luego poder investigar su contribución al control de plagas mediante pruebas biológicas.

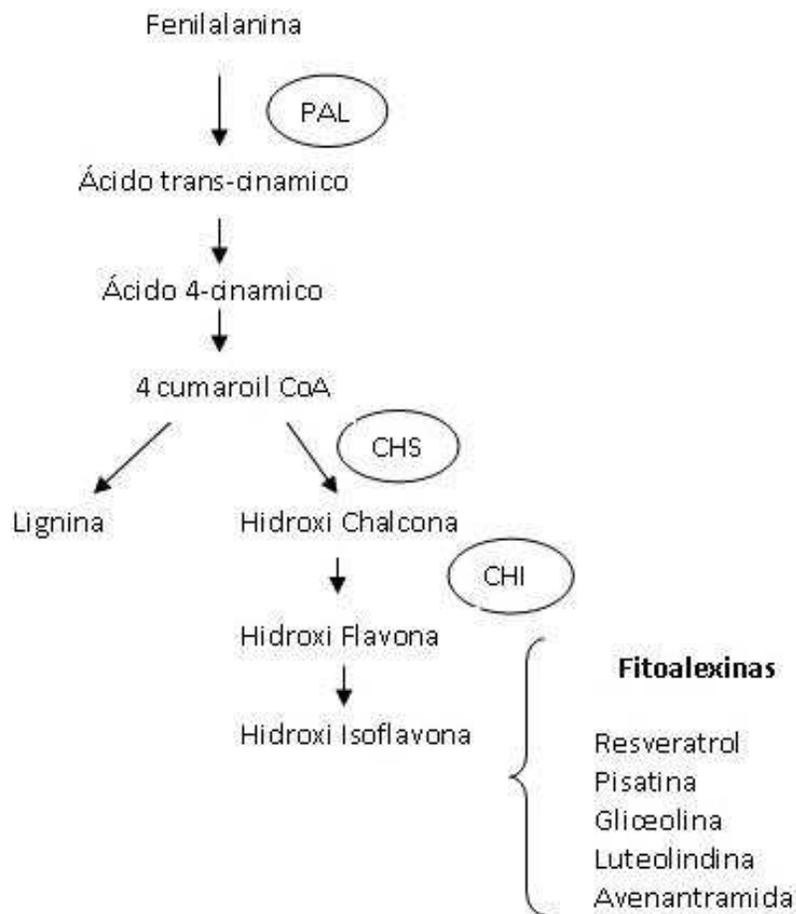


Figura 14. Biosíntesis de fitoalexinas con estructura flavonoide. Sitios de regulación a nivel enzimático: PAL: fenilalanina amonio liasa, CHS: Chalcona sintasa, CHI: Chalcona isomerasa. Adaptado de Ordeñana, 2002

2.5. Interacciones planta-insecto

Los mecanismos de interacción planta-insecto son prácticamente los mismos que los estudiados para las interacciones planta-microorganismos. Los daños por mordeduras o las secreciones orales de los artrópodos actúan como inductores de defensas. Las plantas sintetizan metabolitos secundarios con acción tóxica y compuestos volátiles que actúan como repelentes de insectos. Entre estos últimos se encuentran aldehídos, alcoholes, ésteres y terpenoides, algunos de los cuales son específicos de cada especie. Ciertos compuestos emitidos por las plantas dañadas o sintetizados durante la oviposición de los insectos sirven para atraer enemigos naturales de herbívoros agresores, como por ejemplo ciertos terpenos volátiles combinados con oxilipinas (moléculas derivadas de los ácidos grasos poli-insaturados que se acumulan en respuesta al ataque de patógenos) son distinguidos por avispas parásitas de depredadores. Dentro de los terpenoides, el citronelal (Figura 15) actúa como repelente de insectos y las piretrinas como toxinas del sistema nervioso de los insectos. Los alcaloides presentes en forma constitutiva en algunas plantas pueden incrementarse en respuesta a una herida producida por insectos como es el caso de los N-acil derivados de la nicotina (Capítulo 2: Figura 2) de *Nicotiana sylvestris* que se sintetizan *de novo* en hojas dañadas afectando las larvas de *Manduca sexta* L.

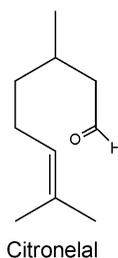


Figura 15. Monoterpenoide repelente de insectos

La berberina y sanguinarina, alcaloides isoquinoleínicos (Figura 16), son tóxicos para insectos y vertebrados. Estos alcaloides interfieren en la transmisión de los impulsos nerviosos inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. Algunos insectos parásitos pueden evitar la intoxicación

con alcaloides utilizándolos para la síntesis de compuestos activos contra sus propios depredadores. Por ejemplo, las larvas de *Utetheisa ornatrix* L. secuestran hasta la adultez los alcaloides pirrolizidínicos producidos por la leguminosa *Crotalaria* (*Crotalaria* spp, *Fabaceae*) los que utilizan como protección de sus depredadores, en este caso arañas nocturnas.

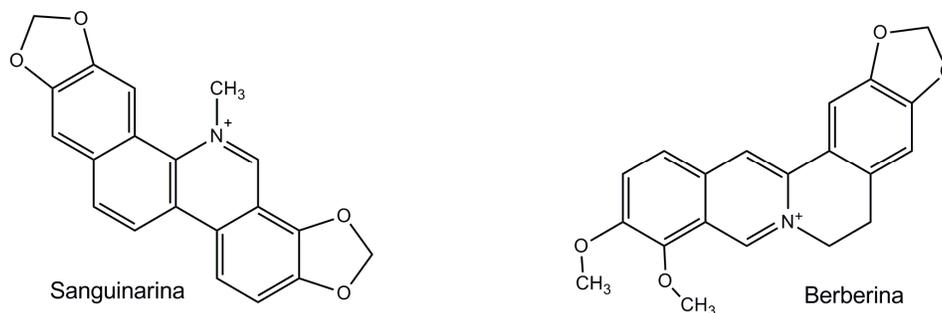


Figura 16. Alcaloides isoquinoleínicos tóxicos para insectos

Los flavonoides pueden modular la ingestión y el desarrollo de la oviposición en los insectos. La enzima polifenoloxidasas cataliza la oxidación de compuestos fenólicos, dando como resultado quinonas sumamente reactivas, que se polimerizan formando productos que atrapan a los insectos o reducen la calidad nutricional de las proteínas. En maíz se ha observado la síntesis de proteasas cisteínicas ante el ataque de insectos. El ataque de insectos activa defensas de tipo local y sistémico mediante vías de señalización en las que están implicados la sistemina, el ácido jasmónico, el ácido galacturónico y el peróxido de hidrógeno.

La sistemina es un pequeño péptido formado por 18 aminoácidos que actúa como mensajero químico implicado en la transducción de señales generada por la mordida de un insecto identificado en plantas de la familia *Solanaceae*. El AJ lidera el sistema de defensa contra insectos herbívoros, que incluye la inducción de inhibidores de proteasas y la síntesis de compuestos fenólicos y enzimas polifenoloxidasas.

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) interviene en la respuesta sistémica adquirida, catalizando el primer paso de la biosíntesis de fenilpropanoides y la

producción de ácido salicílico, el cual regula la producción de otros metabolitos de esta vía como el ácido clorogénico que actúa como disuasorio alimentario (Capítulo 4: Figura 10).

Los niveles de AJ y de AS están estrechamente relacionados. Altos niveles de salicilato inhiben la síntesis de ácido jasmónico y la capacidad de la planta para responder a las señales provenientes de una herida. Por otro lado, el ácido jasmónico bloquea la capacidad del ácido salicílico para producir proteínas inducidas por patógenos.

Las plantas también sintetizan pequeñas proteínas que actúan como inhibidores de proteasas a modo de respuesta al ataque de insectos. Estas proteínas bloquean la acción de proteasas intestinales del insecto y pueden provocar la muerte del mismo. Estos inhibidores se encuentran en granos y otros tejidos de reserva en una proporción de hasta el 15% del contenido total de proteínas. Las señales que inducen la síntesis de estas proteínas incluyen algunos oligosacáridos, ácido abscísico y sistemina.

Para evitar las barreras de defensa de la planta, los insectos desarrollan diversas estrategias como por ejemplo, incrementan su actividad proteolítica, inducen enzimas insensibles a los inhibidores de proteasas o expresan proteínas que degradan a dichos inhibidores producidos por las plantas. Además, algunos insectos desarrollan tolerancia a inhibidores de proteasas e incluso desarrollan mecanismos de detoxificación de metabolitos secundarios. La capacidad de desarrollar una determinada estrategia depende de la especie. Es interesante destacar que las plantas, los insectos y los microorganismos patógenos han sufrido una co-evolución. De esta forma, las plantas han evolucionado desarrollando nuevos mecanismos de detección de patógenos, mientras que éstos han evolucionado desplegando sofisticados mecanismos para sobrepasar la “vigilancia” de la célula vegetal.

2.6. Defensas químicas contra animales herbívoros

Como se ha indicado anteriormente, las plantas pueden sintetizar distintos metabolitos para hacer frente al ataque de herbívoros. Algunos de estos compuestos químicos pueden alterar los procesos digestivos dependiendo de la dosis consumida. Entre ellos se pueden citar a la celulosa, hemicelulosa, lignina y taninos que forman parte de la pared celular vegetal, como así también a la cutina que forma parte de la cutícula. Las ligninas son compuestos que interfieren en la digestión por sí mismas y por acomplejarse con hidratos de carbono o enzimas digestivas.

Los taninos condensados se encuentran en grandes cantidades en plantas leñosas y en algunas herbáceas. Estos compuestos tienen la propiedad de unirse a las proteínas (Capítulo 4) impidiendo su digestión. Algunos animales presentan mecanismos de desactivación de estos compuestos mediante unión a proteínas específicas de la saliva o en los rumiantes por la acción de bacterias ruminales con actividad hidrolítica, lo que les permite aprovecharlos desde el punto de vista nutricional.

Las toxinas vegetales actúan generalmente en bajas dosis, interfiriendo en los procesos bioquímicos fundamentales, bloqueando la actividad de determinadas enzimas. Entre los alcaloides, la cafeína (Capítulo 2: Figura 28) inhibe la síntesis de ADN y ARN; la colchicina (Capítulo 2: Figura 13), inhibe la mitosis celular; y la ergotamina (Figura 17) puede actuar como vasoconstrictor, necrosando los tejidos afectados.

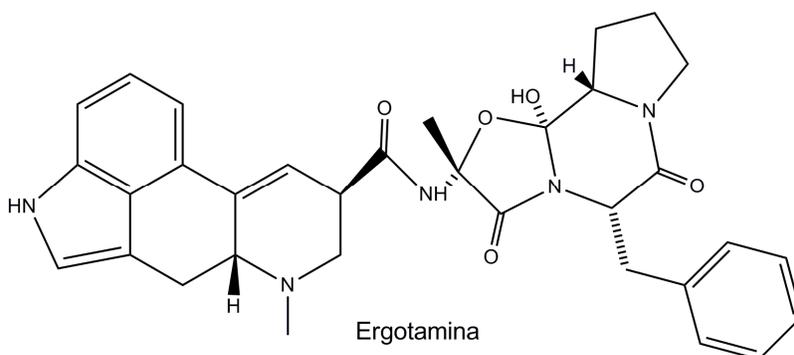


Figura 17. Alcaloide indólico

Los aminoácidos no proteicos y algunas proteínas pueden comportarse como toxinas. Estos aminoácidos y proteínas suelen acumularse en semillas cumpliendo el papel de protección frente a sus posibles consumidores y como reserva de nitrógeno. Por ejemplo, algunas especies del género *Vicia* son capaces de producir β -cianoalanina, que sustituye al aminoácido esencial alanina en la síntesis proteica, causando importantes trastornos a los herbívoros que consumen estas plantas. Un ejemplo de proteína tóxica es la ricina, presente en las semillas de *Ricinus communis*. Por otro lado, en algunas semillas de leguminosas podemos encontrar un tipo de glicoproteínas tóxicas, capaces de coagular los eritrocitos de la sangre, son las llamadas fitohemoaglutininas, con marcados efectos antinutricionales, pues pueden reducir la ingesta e inhibir el crecimiento de los animales afectados.

Tal como ha sido indicado (Capítulo 3), el ácido cianhídrico es una toxina que inhibe la respiración celular, y se encuentra en las plantas en forma de glicósido cianogénico. Cuando los tejidos vegetales de una planta con este tipo de compuestos son dañados, las moléculas del glicósido que están compartimentalizadas, se ponen en contacto con las enzimas (también compartimentalizadas) β -glucosidasa e hidroxinitriloliasa y, a continuación, se producen una serie de reacciones encadenadas que dan como resultado la liberación de ácido cianhídrico. Esta sustancia actúa en las mitocondrias bloqueando la acción de la enzima citocromo oxidasa, paralizando el transporte electrónico en la respiración celular, con consecuencias a veces letales para el herbívoro.

Los glucosinolatos actúan como repelentes alimenticios y pueden ser tóxicos para los herbívoros cuando se encuentran en altas concentraciones. La toxicidad de estos compuestos se debe a la capacidad que tienen para liberar isotiocianatos, compuestos potencialmente tóxicos, por acción de la enzima mirosinasa presente en la planta (Capítulo 3). Los glucosinolatos tienen una elevada actividad irritante del tracto intestinal, pudiendo provocar gastroenteritis aguda en el ganado. Estos compuestos se encuentran principalmente en especies de la familia *Cruciferae*, destacándose algunas especies silvestres del

género *Brassica*. Su concentración es elevada en semillas mientras que en tallo, hojas y raíces es diez veces menor (Duncan y Milme, 1989).

Algunas investigaciones sobre la colza (*Brassica napus*), una especie productora de aceite, se han centrado en la obtención de variedades con bajos niveles de glucosinolatos en los granos con el objetivo de aprovechar el elevado contenido de proteínas de éstos, luego de la extracción del aceite, y utilizarlos en alimentación animal. Estas variedades resultaron ser muy sensibles al ataque de plagas, es por ello que posteriormente se desarrollaron variedades con bajos niveles de glucosinolatos en semillas y alto contenido en hojas para mejorar su resistencia a las plagas.

Muchas especies de leguminosas forrajeras producen fitoestrógenos como mecanismo de defensa. Químicamente estos compuestos pertenecen a los grupos de flavonoides, isoflavonas, lignanos y estilbenos (Capítulo 4). Actúan principalmente sobre el sistema reproductivo de mamíferos, pudiendo afectar también el sistema renal, nervioso y cardiovascular. Entre los compuestos con actividad estrogénica diferenciados en especies del género *Trifolium* se encuentran las isoflavonas biochanina, formononetina (Figura 18) y genisteína y un cumestrano, el cumestrol (Capítulo 4: Figura 17). La concentración de este tipo de compuestos en la planta es variable dependiendo del estado fenológico y del ambiente. Por ejemplo, en el trébol rojo (*Trifolium pratense*) la concentración de formononetina es elevada antes de la floración y disminuye a partir de dicho estado (Boué *et al.*, 2003). Las semillas de la soja (*Glycine max*) son ricas en isoflavonas, principalmente la genisteína y la daidzeína (Capítulo 4: Figura 17).

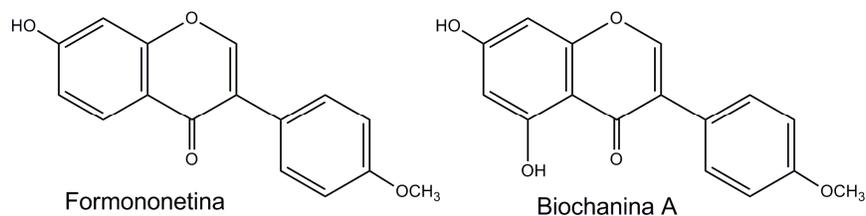


Figura 18. Compuestos con actividad estrogénica diferenciados en el género *Trifolium*

3. Relaciones simbióticas entre microorganismos y plantas. Participación de compuestos químicos vegetales

Los microorganismos del suelo son los responsables de la ejecución y el control de muchas de las funciones esenciales que se llevan a cabo en él, como la descomposición de la materia orgánica, la producción de humus, el reciclaje de nutrientes, el flujo de energía, la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de nutrientes esenciales, la producción de compuestos complejos que facilitan la agregación del suelo y la descomposición de xenobióticos², entre otros (Moreira y Siqueira, 2002).

Muchos de estos microorganismos son benéficos y cumplen un papel fundamental; entre ellos se destacan los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), los microorganismos fijadores de nitrógeno y las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Azcón, 2000). Todos ellos influyen no sólo en el crecimiento y desarrollo de las plantas sino también contribuyen a la protección contra distintos tipos de estrés biótico y abiótico.

La mayoría de las plantas captan los nutrientes por medio de interacciones que establecen con los microorganismos que viven en la rizósfera, especialmente con aquéllos denominados simbioses.

3.1. Micorrizas. Interacciones químicas involucradas en el proceso de micorrización

Las micorrizas son definidas como una asociación simbiótica mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas y ciertos hongos del suelo. En esta asociación mutualista, el hongo coloniza biotróficamente las células corticales de la raíz, sin causar daño a la planta, llegando a convertirse fisiológica y morfológicamente en parte integrante de dicho órgano. La planta hospedante proporciona al hongo los carbohidratos necesarios para su metabolismo y un hábitat ecológico protegido, mientras el hongo facilita a la

planta la absorción de agua y nutrientes como el nitrógeno, calcio, potasio, cobre, zinc, magnesio y especialmente fósforo, un nutriente limitante en muchos suelos (Genre *et al.*, 2005).

Esta simbiosis mejora también la tolerancia de las plantas a distintos tipos de estrés biótico o abiótico (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Smith y Read, 2008), mejora las características de los suelos y favorece la diversificación de especies vegetales en los ecosistemas (Smith y Read, 2008).

Los hongos formadores de micorrizas son algunos de los microorganismos beneficiosos más estudiados en la actualidad. El hombre ha logrado aislarlos y reproducirlos con el objetivo de emplearlos con fines productivos y ecológicos.

Los tipos más comunes y conocidos de micorrizas son las ectomicorrizas y las endomicorrizas. Cada tipo se distingue en función de la relación de las hifas del hongo con las células radicales de la planta hospedante (Popoff, 2008). Las ectomicorrizas forman un micelio que invade la raíz por fuera de sus células, mientras que en las endomicorrizas el micelio invade la raíz, en primera instancia en forma intercelular y luego penetra en el interior de las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales. Las endomicorrizas son simbiosis obligados, no pudiendo ser desarrollados en cultivo puro, o sea en ausencia de su hospedante, contrariamente a los hongos ectomicorrízicos.

Las endomicorrizas son las más abundantes y dentro de éstas, las del tipo arbusculares (HMA) son las que forman la mayoría de las plantas de interés agrícola. Estos hongos se encuentran naturalmente en la rizósfera, pero ciertas prácticas agrícolas pueden disminuir su población haciéndose necesaria su incorporación mediante la inoculación de las plantas. La importancia de las micorrizas en la agricultura radica en que por su extenso micelio extra-radical se forma un vínculo entre la planta y el suelo aumentando el área de exploración de las raíces, favoreciendo la absorción de agua y nutrientes poco móviles.

Los hongos micorrízicos arbusculares constituyen un insumo microbiológico de importancia para el desarrollo de una agricultura sustentable. Debido a su papel en el funcionamiento de los ecosistemas y su potencial aplicación como

fertilizantes biológicos, pueden ser considerados como componentes importantes de la diversidad biológica del suelo (Guerra Sierra, 2008).

3.1.1. *Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares*

La invasión de estos hongos provoca en las plantas una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos específicos producidos por señales de reconocimiento emitidas por las plantas y el hongo. Las señales bioquímicas implicadas en la simbiosis están relacionadas con metabolitos secundarios exudados por las raíces de las plantas, los cuales estimulan el crecimiento de las hifas y la formación de las distintas estructuras del hongo. Las primeras señales habitualmente generan en las plantas respuestas defensivas débiles y localizadas, las cuales no impiden la colonización del hongo.

Los exudados radicales y los secretados por las HMA activan la expresión de genes que favorecen cambios a nivel celular y que posibilitan el desarrollo del hongo en la raíz. Las primeras señales bioquímicas están relacionadas con compuestos volátiles exudados por las raíces. El CO₂ es una molécula fundamental para la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas (Bago *et al.*, 2000). Si bien la colonización de las raíces es controlada por la planta (Bonfante *et al.*, 2000), se ha determinado que la comunicación planta-hongo modifica la expresión de genes del hongo relacionados con señales de reconocimiento (Requena *et al.*, 2002).

La ruta de biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides genera una amplia gama de metabolitos implicados en la señalización de los procesos de simbiosis, junto a otros compuestos como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares reductores y hormonas. Muchos de estos compuestos son exudados por raíces de plantas leguminosas y afectan la germinación de esporas, el crecimiento de las hifas y la colonización de las HMA.

Mandelbaun y Piche (2000) observaron un efecto sinérgico del CO₂ y los flavonoides exudados por las raíces de las plantas en el estímulo del crecimiento de las hifas de estos hongos. Las estrigolactonas (Figura 19) son lactonas terpénicas que derivan de los carotenoides, las cuales son exudadas

por las raíces, constituyendo un “factor de ramificación”. Fueron identificados en *Lotus japonicus* y luego aislados en un gran número de plantas demostrando ser de fundamental importancia en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama *et al.*, 2005). En papa, la formononetina (Figura 18) estimula la esporulación y la efectividad de hongos micorrícicos (Davies *et al.*, 2005). Scervino *et al.* (2005), determinaron que los flavonoides kaempferol, luteolina, rutina, morina y crisina (Figura 20) estimulaban la germinación de esporas y la elongación y ramificación de hifas de los hongos micorrícicos *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* y *G. intraradices*, asociados con trébol blanco.

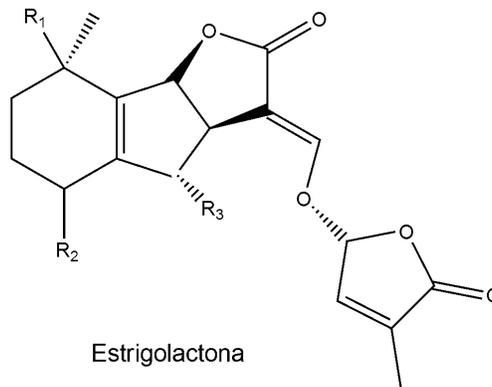


Figura 19. Lactona terpénica que actúa como molécula de señalización celular endógena y en la rizosfera, con función hormonal

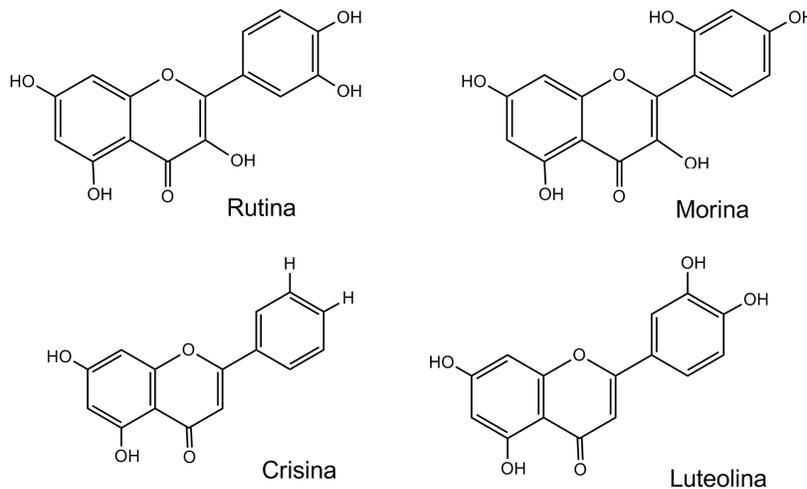


Figura 20. Compuestos fenólicos involucrados en la simbiosis planta-HMA

Las hormonas vegetales también están involucradas en las relaciones simbióticas que forman las HMA. Las citoquininas y auxinas muestran efectos positivos en el crecimiento del hongo, mientras que las giberelinas presentan respuestas tanto positivas como negativas en las HMA.

Los niveles de AJ y etileno se ven incrementados en las raíces de plantas micorrizadas durante el proceso de establecimiento de la asociación con HMA, relacionando esta respuesta con el aumento de la resistencia a algunas plagas, en plantas micorrizadas (Ramírez Gómez y Rodríguez, 2012).

Las señales de reconocimiento y la inducción de respuestas de defensa de la planta en la simbiosis con HMA han sido estudiadas comparándolas con las otras interacciones planta-microorganismo, como es el caso de la simbiosis leguminosa-rizobios, y de algunos hongos y nematodos patógenos. A pesar de ello aún no son claros los mecanismos de defensa que se activan bajo la simbiosis, pero se conoce que la alteración de la expresión de genes de defensa tiene un papel particular o funcional en el establecimiento de la misma.

3.2. Simbiosis Rizobios-Leguminosas

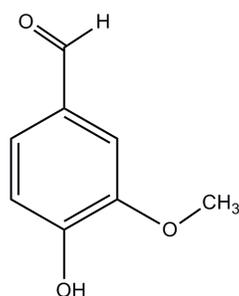
Los nódulos formados en las raíces de las plantas leguminosas constituyen una estructura altamente organizada que se desarrolla como resultado de la relación simbiótica entre las plantas leguminosas y las bacterias del suelo del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*. Dentro del nódulo radicular, las bacterias invasoras diferencian bacteroides fijadores de nitrógeno que proporcionan nitrógeno reducido a la planta a cambio de carbohidratos.

El establecimiento de la simbiosis requiere de mecanismos de señalización y reconocimiento por parte de ambos, en los que intervienen muchos metabolitos secundarios. Debido a la importancia que presenta esta simbiosis en la fijación de nitrógeno, muchas de las etapas del reconocimiento planta-bacteria, como la formación de nódulos y fijación de nitrógeno, han sido bien estudiadas.

Durante el proceso de establecimiento de nódulos, las semillas y raíces de las plantas sintetizan compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos y flavonoides, glicina-betaína (compuesto cuaternario presente en bacterias, cianobacterias, algas, animales y varias familias de plantas y ausente en muchos cultivos de interés agrícola, relacionada con el estrés osmótico) y ácidos aldónicos como moléculas señales de la simbiosis. Estos compuestos actúan como quimio-atrayentes, guiando a las células de los rizobios hacia las raíces de las leguminosas.

Se ha demostrado que algunos flavonoides exudados por las raíces de las plantas pueden estimular o inhibir la expresión de genes *nod* que participan en esta simbiosis. Los genes *nod* son un grupo de genes de nodulación de las especies de Rizobios necesarios para la inducción de la división celular de las células corticales y la curvatura de los pelos radiculares en el inicio de la infección. Es posible que tanto los flavonoides como los ácidos fenólicos, por su función como antioxidantes, actúen como protectores de procesos oxidativos en las células en división.

Se comprobó que las raíces de *Vicia faba* secretan flavonas y flavonoles; las de soja, isoflavonas y las raíces de maní, vainillina (Figura 21) como reguladores de la expresión de genes *nod* en el simbiote. Los genes *nod* están implicados en la síntesis de lipo-quito-oligosacáridos (LCO), moléculas señales producidas por los rizobios que median el reconocimiento y la organogénesis del nódulo en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa denominados factores *nod*, los que inducen también la acumulación de flavonoides y chalconas (Mandal *et al.*, 2010).



Vainillina

Figura 21. Compuesto fenólico regulador de la expresión de genes *nod* en *Arachis hypogaea*

Los ácidos fenólicos cinámico, gálico, *p*-cumárico, protocatéquico, también actúan como inductores de la simbiosis planta-microorganismos. La interacción entre los compuestos fenólicos y sus derivados y la ecología de la simbiosis planta-microorganismo es muy compleja y aún quedan muchas preguntas por responder en lo que respecta a sus efectos.

La incorporación de microorganismos benéficos en la agricultura constituye una práctica compatible con un manejo sustentable de los agroecosistemas. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares, las bacterias fijadoras de nitrógeno, microorganismos solubilizadores de fósforo y bacterias promotoras del crecimiento son organismos amigables con el ambiente ya que se encuentran naturalmente en la rizósfera, pero debido al uso indiscriminado de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios, los suelos ven disminuida su población. Por lo tanto, la inclusión de estos microorganismos como potenciales fertilizantes biológicos o biofertilizantes permitiría aumentar los rendimientos de los cultivos sin causar daño al ambiente.

4. Alelopatía

Algunas plantas poseen la capacidad de liberar compuestos químicos que influyen en el crecimiento y desarrollo de otras especies vegetales. Este mecanismo se conoce como alelopatía. Por lo tanto la alelopatía representa el área de la Bioquímica Ecológica que estudia las interacciones entre plantas. La primera definición de dicho término (del griego *allelon* = uno al otro y *pathos* = sufrir; efecto injurioso de uno sobre otro) fue la de Molish en 1937. En ella se incluían las interacciones bioquímicas ya sean benéficas o perjudiciales entre algas, hongos, bacterias y plantas superiores. Debido a la dificultad de discernir si el efecto que produce una planta sobre otra se debe a un compuesto químico en particular o a la competencia por recursos, en 1969 Muller introdujo el término de *interferencia*, para referirse al conjunto de los efectos alelopáticos y también los de competencia por espacio y recursos (agua, nutrientes, luz). Más tarde Rice (1974) la definió como el conjunto de efectos inhibitorios. La

International Allelopathy Society en el año 1996, define la alelopatía como: “Cualquier proceso que implica metabolitos secundarios producidos por especies exóticas que influyen en el crecimiento y desarrollo de las especies nativas (excluyendo los animales), comprendiendo efectos positivos y negativos”. Esta definición se amplió luego a cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos.

Los compuestos alelopáticos que desencadenan este proceso se denominan agentes o sustancias alelopáticas. La acción fitotóxica de dichos metabolitos depende de su concentración, persistencia y destino en el medio donde son liberados. Muchas veces la actividad alelopática está originada por la acción conjunta de varios compuestos químicos, y no uno solo en particular. También puede deberse a un subproducto de la descomposición por microorganismos del suelo.

Entre los metabolitos con actividad alelopática se encuentran ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos y cetonas alifáticos; lactonas, quinonas (juglona, tetraciclina), terpenoides como cineol, alcanfor, limoneno; fenoles simples como el ácido gálico, vanílico, hidroquinonas, derivados del ácido cinámico como el ácido clorogénico y ferúlico, cumarinas como la escopoletina y umbeliferona (Figura 22 a, b), flavonoides como la catequina, quercetina; taninos condensados e hidrolizables; lignanos; antocianinas; aminoácidos y péptidos; alcaloides como atropina, codeína (Figura 22 c, d) y estricnina (Capítulo 2: Figura 4); aminas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. El grupo de los compuestos fenólicos comprende el mayor número de representantes.

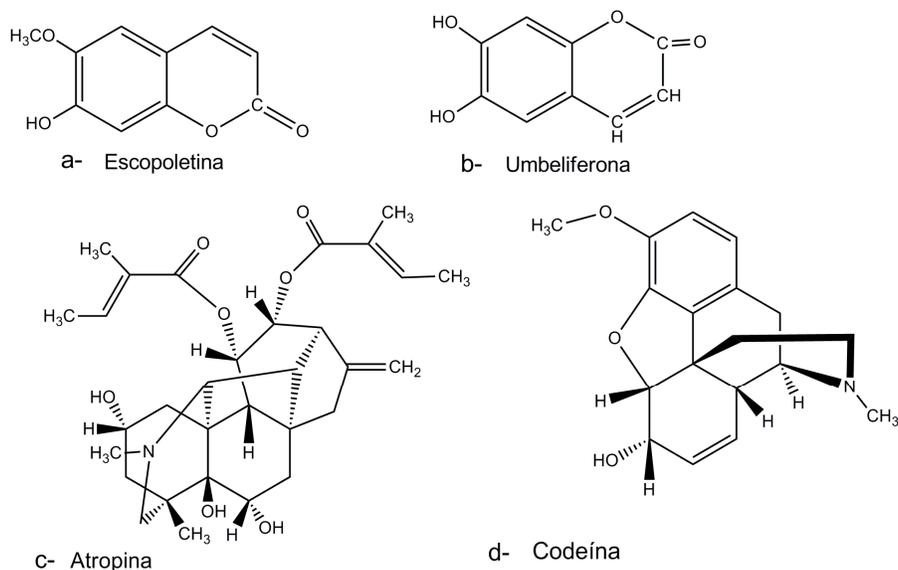


Figura 22. Cumarinas y alcaloides con actividad alelopática

Estos compuestos se encuentran en todos los órganos vegetales tales como hojas, flores, frutos, tallos aéreos y subterráneos y en raíces de diversas especies, siendo las hojas y las raíces las fuentes más importantes de aleloquímicos. Se sintetizan y almacenan en distintos tipos de células en forma libre o conjugada con otras moléculas y son liberados al entorno en respuesta a distintas situaciones en las que comúnmente están involucradas condiciones de estrés biótico y/o abiótico.

Su concentración depende de la especie, edad, órgano e incluso del medioambiente. Algunos se encuentran compartimentalizados como se observa en *Mentha spicata*, que acumula el monoterpeno carvona en los tricomas. Otros compuestos pueden estar presentes en forma inactiva como ocurre con la juglona presente en el género *Juglans*. Este compuesto se sintetiza como precursor inactivo no tóxico (hidroquinona) en las partes verdes y frutos y cuando es arrastrado al suelo por las lluvias se hidroliza y oxida transformándose en juglona, altamente tóxica (Capítulo 4, Figura 6).

4.1. Mecanismos de acción alelopática

La diversidad de estructuras químicas con acción alelopática hace que no exista un único mecanismo de acción de estas sustancias. El estudio de dichos mecanismos es dificultoso debido a que estos metabolitos se presentan en la naturaleza en concentraciones muy pequeñas y, sumado a esto, se verifica la existencia de interacciones sinérgicas y aditivas con otros compuestos.

Estos metabolitos interfieren en distintas rutas metabólicas manifestando como principal respuesta visible la inhibición de la germinación de semillas y alteraciones en el crecimiento de las plantas.

Entre los procesos metabólicos que se ven afectados se encuentran: la síntesis y actividad de enzimas tales como catalasa, peroxidasas, fenilalanina amonio liasa; enzimas hidrolíticas como amilasas, invertasas y proteasas; alteración de la actividad hormonal; respiración; fotosíntesis; alteración de la permeabilidad de las membranas plasmáticas; absorción de nutrientes y agua.

Por ejemplo, las plántulas de maíz tratadas con ácido ferúlico muestran un incremento en los niveles de enzimas oxidativas (peroxidasas, catalasa) junto con un aumento de enzimas de la ruta del ácido shikímico tales como fenil alanina amonio liasa y la cinamil alcohol deshidrogenasa, involucradas en la vía de síntesis de fenilpropanoides.

Los ácidos benzoico y cinámico en bajas concentraciones pueden inhibir el transporte de electrones en la fase lumínica de la fotosíntesis. El kaempferol actúa inhibiendo la síntesis de ATP. La sorgoleona (Figura 23), una benzoquinona presente en exudados radiculares de sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*), actúa desacoplando el transporte de electrones en el fotosistema II. La juglona inhibe la respiración a bajas concentraciones, afectando la incorporación de oxígeno en la mitocondria. Los flavonoides como la quercetina y naringenina (Figura 24) inhiben la producción de ATP en la mitocondria. Algunos flavonoides inhiben la absorción de minerales esenciales como fósforo, potasio, magnesio, hierro y calcio.

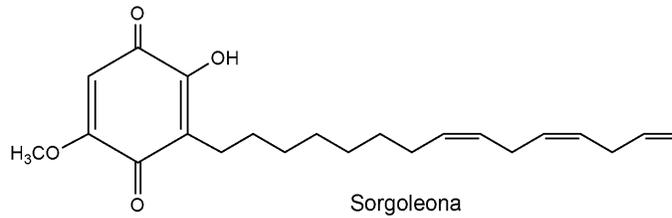


Figura 23. Benzoquinona aislada en sorgo de Alepo con actividad alelopática

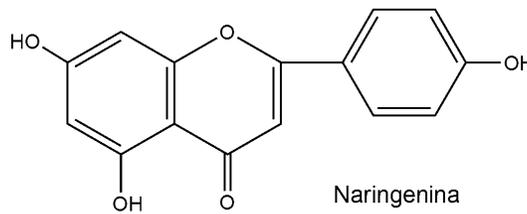


Figura 24. Flavonoide con actividad alelopática

Las sustancias alelopáticas también pueden actuar sobre el metabolismo de las hormonas vegetales. Por ejemplo, pueden reducir o incrementar la concentración de ácido indol acético (AIA). Los ácidos *p*-hidroxibenzoicos, *p*-cumárico, vainillínico reducen la disponibilidad de AIA, e inhiben la acción de giberelinas, mientras que algunos di y polifenoles como los ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico y protocatéquico producen incrementos en el crecimiento inducidos por AIA. El flavonoide naringenina estimula enzimas del tipo AIA oxidasa, involucradas en la degradación de auxinas. La acción del ácido ferúlico y otros fenólicos inhibe el crecimiento de plántulas de pepino lo que se correlacionó con el aumento en los niveles de ABA.

De acuerdo a Einhellig (1995), los compuestos fenólicos pueden alterar distintas rutas metabólicas pero parece que el efecto más importante es sobre las membranas plasmáticas.

4.2. Mecanismos de liberación

Las plantas pueden liberar los compuestos alelopáticos al entorno través de cuatro vías principales, dependiendo de la naturaleza química de dichos

compuestos. Dichas vías corresponden a: la *lixiviación* de sustancias solubles a partir de tallos y hojas o residuos de aquellos que caen al suelo; la *volatilización* desde los tejidos aéreos; la *exudación* por las raíces y la *descomposición* de residuos, tejidos muertos que quedan depositados en el suelo y sufren biodegradación, liberándose las sustancias producidas por la descomposición de dichos residuos a partir de la acción de microorganismos (Figura 25).

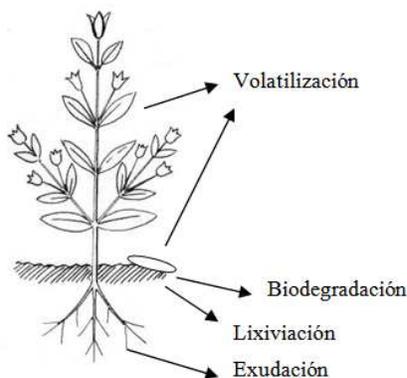


Figura 25. Vías de liberación de compuestos alelopáticos

4.2.1. Volatilización

La *volatilización* es la vía por la que se liberan comúnmente compuestos con altos valores de tensión de vapor como los terpenoides, hidrocarburos de estructura lineal, fenilpropenos y compuestos sulfurados. En determinadas concentraciones estos compuestos volátiles actúan inhibiendo la germinación de semillas y el crecimiento de raíces de plántulas. Las condiciones ambientales de tiempo cálido y seco favorecen la volatilización de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropenos, los cuales se adsorben a las partículas del suelo.

Ejemplos: Los monoterpenos α -pineno, β -pineno y cineol presentes en *Salvia reflexa* inhiben la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas; los glucosinolatos de *Brassica napus* y *Raphanus sativus* inhiben la germinación de lechuga y trigo; el cineol presente en *Eucalyptus globulus* inhibe la germinación y crecimiento de plantas de interés agrícola; el timol, carvacrol,

carvona y limoneno de *Mentha spicata*, *Ocimum basilicum* y *Salvia officinalis* inhiben la germinación de semillas de alfalfa y *Lolium perenne* (Figura 26).

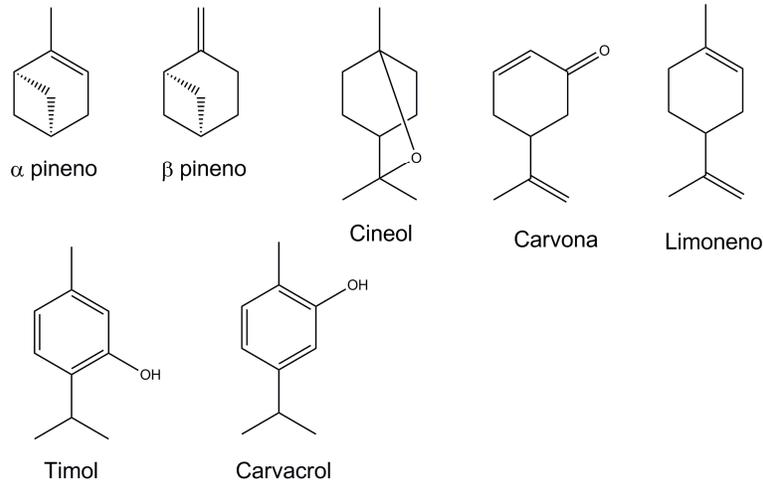


Figura 26. *Terpenoides con actividad alelopática liberados por volatilización*

4.2.2. Lixiviación

La *lixiviación* consiste en la remoción de sustancias no volátiles acumuladas en las capas superficiales de los órganos vegetales por efecto de la lluvia, niebla, rocío o nieve. Estos compuestos suelen acumularse en estructuras epidérmicas especializadas como tricomas y pelos glandulares, aunque se ha demostrado que las semillas también pueden liberar estas sustancias al suelo. Los aleloquímicos pueden también ser lixiviados a partir de restos vegetales que caen al suelo. En general las sustancias liberadas por esta vía son solubles en agua como ocurre con los compuestos fenólicos, alcaloides, ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, ácidos giberélicos. También se han encontrado algunos compuestos de estructura terpénica.

Ejemplos: *Datura stramonium* produce los compuestos escopolamina y atropina que inhiben el crecimiento de trigo y soja; el alilisotiocianato de *Brassica napus* inhibe el crecimiento de soja; la especie *Calamintha ashei* contiene (+) evodona

y desacetilcalamintona que inhiben la germinación y crecimiento de *Rudberkia hirta* y *Leptochloa dubia* (Figura 27).

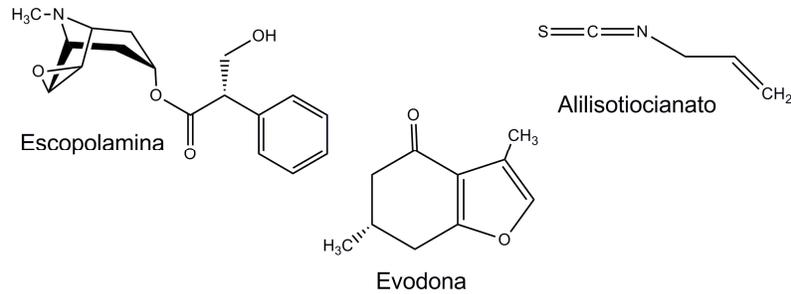


Figura 27. Aleloquímicos liberados por lixiviación

4.2.3. Exudación

Las plantas que liberan compuestos alelopáticos al suelo por *exudación* lo hacen generalmente a través de sus raíces. La composición y la concentración de los aleloquímicos liberados dependen de la edad de la planta, el estado de nutrición, irradiancia, humedad y composición del suelo. Los aleloquímicos exudados por las raíces tienen efectos inhibitorios sobre la germinación de semillas, crecimiento de raíces, nodulación y absorción de nutrientes. Entre los compuestos químicos exudados por las raíces se encuentran los ácidos cinámico, benzoico e hidroxicinámico, flavonoides, cumarinas, alcaloides como también metabolitos primarios como aminoácidos, azúcares.

Entre las especies cultivadas que presentan actividad alelopática se pueden citar: el centeno, la avena, la cebada, el maíz, el tomate y el pepino.

También las malezas pueden liberar toxinas y provocar la reducción del rendimiento de ciertos cultivos que crecen en forma conjunta. Ejemplos de malezas con estas características son *Setaria faberii* Herm (Pega-pega), *Sorghum halepense* L. (Sorgo de Alepo), que libera sorgoleona que inhibe el crecimiento de raíces, *Aristida spp* (coiron), *Bromus spp*, *Wedelia glauca* (sunchillo) cuyos diterpenos y esteroides inhiben la germinación y elongación de la radícula de tomate, pepino y rabanito.

Especies cultivadas como *Cucumis sativus* contienen ácidos benzoico, clorogénico, mirístico y palmítico que inhiben el crecimiento de lechuga; la *Avena spp* puede inhibir el crecimiento de la raíz y brote de la espiga de trigo por exudación de escopoletina y ácido vainillínico.

4.2.4. *Descomposición de residuos vegetales. Biodegradación*

Otro mecanismo consiste en la liberación de sustancias producidas como resultado de la *descomposición de residuos vegetales*. Este proceso está influenciado por la naturaleza del residuo, el tipo de suelo y factores ambientales. Los microorganismos del suelo pueden producir la transformación de los compuestos no tóxicos liberados originando otros con efectos tóxicos. Este tipo de liberación suele causar inconvenientes en los sistemas de cultivo de siembra directa. La siembra sobre los rastrojos con toxinas que fueron liberadas por los cultivos antecesores podría provocar efectos nocivos sobre la emergencia, crecimiento y productividad del cultivo siguiente. Por otro lado los mismos residuos podrían ser beneficiosos al inhibir la germinación de ciertas malezas. Por este motivo, el conocimiento de los efectos alelopáticos de unas especies sobre otras permitiría determinar la compatibilidad entre ellas y poder llegar a establecer las asociaciones de cultivos más adecuadas con el objetivo de mejorar la producción.

Ejemplos: *Agropyron repens* inhibe el crecimiento de plantines de alfalfa, maíz y soja al liberar ácido 5-hidroxi indol 3-acético; en extractos de *Sorghum halepense* L. se han identificado ácidos clorogénico, cumárico, hidroxibenzoico y vainillínico con efectos inhibitorios sobre la germinación y crecimiento de girasol, tomate y rabanito; polifenoles y sesquiterpenos de *Cyperus rotundus* L. inhiben el crecimiento de tomate, arroz, caña de azúcar, pepino, soja y algodón; la escopolina, escopoletina y los ácidos benzoico, clorogénico, cumárico, gentísico y vainílico presentes en extractos de *Imperata cylindrica* inhiben el crecimiento de maíz, centeno, sorgo y tomate; los ácidos benzoico,

cafeico, clorogénico y cumárico de *Xanthium spp* inhiben la germinación y crecimiento de trigo, maíz, tabaco, garbanzo, repollo y lechuga.

La acción alelopática de ciertos compuestos químicos liberados por las especies vegetales se evalúa generalmente en forma experimental en ensayos de laboratorio, analizando los efectos de extractos obtenidos a partir de distintas especies vegetales sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas, debido a su sencillez y rápida evaluación de la respuesta de la planta al agente alelopático. Estos estudios deberían en el futuro ser corroborados en condiciones de campo, lo que resulta ser mucho más engorroso debido a las múltiples interacciones que se dan a nivel de la rizósfera.

4.3. Alelopatía y la aplicación en búsqueda de herbicidas

Las malezas constituyen uno de los principales problemas que afectan en forma negativa los rendimientos de los cultivos. Es por este motivo que en las últimas décadas el uso excesivo de herbicidas sintéticos como práctica de manejo para su control ha alterado la biodiversidad de los agroecosistemas, lo que resulta en un riesgo potencial para los seres humanos y el medio ambiente.

El aumento de la resistencia de las malezas a los herbicidas junto con la búsqueda de alternativas de manejo sustentable ha impulsado el desarrollo de nuevos herbicidas que permitan controlar las malezas resistentes a los herbicidas tradicionales y de biocidas de bajo impacto ambiental que sustituyan a aquéllos de origen sintético.

Las sustancias liberadas por las malezas o por residuos de cultivos precedentes pueden provocar la caída del rendimiento de los cultivos.

El conocimiento de las propiedades alelopáticas de determinados compuestos liberados por algunas especies podría ser utilizado con fines agrícolas, ya sea para la obtención de variedades de plantas cultivadas tolerantes a las sustancias alelopáticas, programación de rotaciones de cultivos o la producción

de herbicidas de origen natural con el fin de mejorar el rendimiento de las plantas en producción.

Una práctica de manejo para el control de malezas es la de intercalar dos o más cultivos, donde uno de ellos presenta actividad alelopática sobre las malezas. Un ejemplo es el cultivo de maíz intercalado con zapallo, donde los aleloquímicos liberados por el zapallo controlan las malezas del cultivo de maíz. La identificación de especies vegetales con principios activos fitotóxicos junto con el mejoramiento de las técnicas de extracción, aislamiento e identificación de dichos compuestos permitiría la búsqueda de moléculas con aplicación agronómica.

Las industrias del sector agroquímico plantean el uso directo de estos compuestos en formulaciones de herbicidas, la mejora genética de plantas cultivadas que sintetizen naturalmente sustancias con potencial alelopático o la obtención de otros agroquímicos sintetizados a partir de productos naturales.

Si bien la investigación sobre la alelopatía data de varias décadas, aún queda mucho por estudiar. Una ventaja de estos compuestos es que la mayoría son solubles en agua lo que hace que sean activos a bajas concentraciones reduciendo su permanencia en el ambiente y resultando por lo tanto ecológicamente adecuados.

A pesar de ello, la búsqueda de compuestos con actividad herbicida potencial no es sencilla, presenta algunas dificultades como por ejemplo, la cantidad de principio activo presente en los vegetales es generalmente reducida, las rutas de biosíntesis son complejas y los costos de aislamiento son elevados. El uso de compuestos aislados de las plantas con propiedades alelopáticas requiere también de la realización de pruebas toxicológicas con el objetivo de garantizar su inocuidad para el ambiente y los animales.

Ejemplos de aplicación:

Se ha aumentado la fitotoxicidad del compuesto 1,8 cineol, con propiedades aleloquímicas, modificado su estructura molecular, comercializado bajo el nombre de "Cinmetileno".

Se está investigando el incorporar las características alelopáticas en cultivares mejorados de arroz a partir de variedades de arroz con propiedades

alelopáticas, con el objetivo de reducir la necesidad de aplicar herbicidas al cultivo, pero hasta el momento no se han obtenido cultivares comerciales (Duke *et al.*, 2001).

Herbicidas comerciales formulados a partir de moléculas de origen natural:

- Cinmetilina: ha sido aplicado para el control de malezas durante periodos corto de tiempo.
- Bialafos: es actualmente comercializado en Japón bajo el nombre de Herbace[®].
- Mesotrione: es un derivado químico de la leptospermona, un componente de los aceites esenciales de *Leptospermum scoparium*, el ingrediente activo del herbicida comercial Callisto[®], un herbicida sistémico, selectivo y de aplicación post emergente, que puede controlar malezas que han desarrollado resistencia a la atrazina, herbicida selectivo, principalmente aplicado en cultivos de maíz.
- Sulcortiona: derivado de la leptospermona. Este compuesto ha sido comercializado en Europa por la Bayer Crop Science bajo el nombre de Mikado[®], siendo también un herbicida post emergente, utilizado ampliamente en los cultivos del maíz y caña de azúcar frente a una gran variedad de malezas.

Los compuestos microbianos poseen un elevado potencial fitotóxico. La tentoxina, la hidantocidina y la gostatina son herbicidas de origen microbiano (Figura 28).

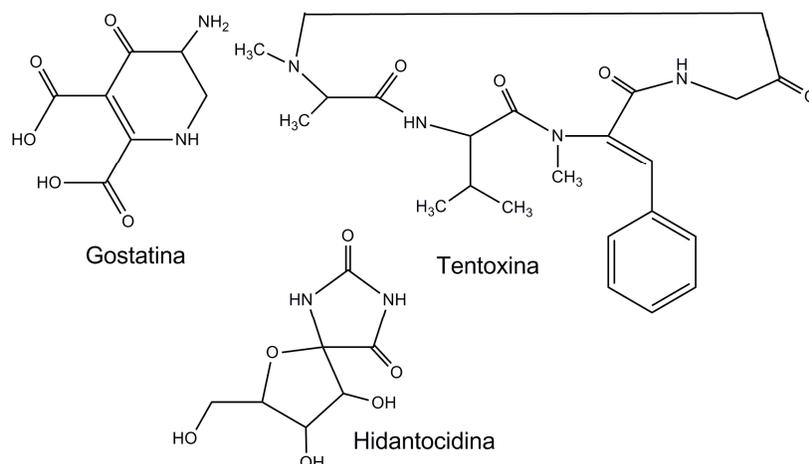


Figura 28. Compuestos microbianos con actividad herbicida

Los ácidos hidroxicinámicos derivados de la benzoxacinona presentan un potencial alelopático particularmente importante (Regnault *et al.*, 2004) ya que muestran una relativa selectividad, siendo algunos activos para dicotiledóneas o monocotiledóneas. La principal vía de liberación de estos compuestos es la exudación radicular. Al ser liberados al suelo sufren una degradación microbiana y química que los transforma en benzoxazolinonas (Figura 29).

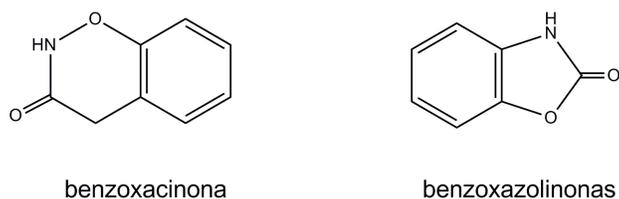


Figura 29. Ácidos hidroxicinámicos con potencial alelopático

Estos compuestos se encuentran en muchas variedades de gramíneas como trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum spp*) o centeno (*Secale cereale*) actuando como sustancias alelopáticas para algunas plantas, detoxificando herbicidas y otorgando resistencia a insectos, hongos o bacterias patógenas. Extractos etéreos obtenidos a partir de centeno pueden inhibir el crecimiento de la raíz y los cotiledones de algunas malezas sin causar toxicidad a los cultivos de maíz, trigo y centeno, lo que los hace apropiados para ser utilizados como herbicidas naturales (Leicach, 2006).

Dentro de estos ácidos, dos son las moléculas cuantitativamente más importantes en estos cereales la DIBOA (2,4 dihidroxi-1,4 benzoxacin-3-ona) y DIMBOA (2,4 dihidroxi-7-metoxi-1,4 benzoxacin-3-ona) (Figura 30). Se pueden encontrar en todas las partes de la planta, presentando su máxima concentración en el estado de plántula (Regnault *et al.*, 2004). Se ha determinado que estos compuestos son los mayores factores de resistencia a áfidos en trigo, favoreciendo la presencia de insectos benéficos (Leicach, 2006).

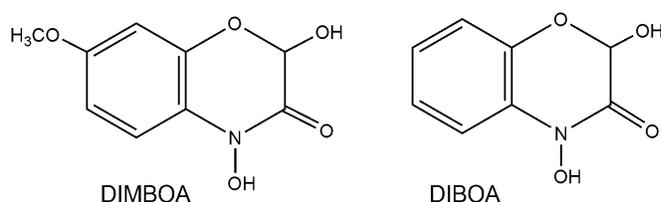


Figura 30. Ácidos hidroxicinámicos derivados de la benzoxacinona con actividad alelopática

5. Adaptaciones bioquímicas frente a factores de estrés abiótico

Como ya se mencionó anteriormente las plantas no poseen la capacidad de trasladarse en busca de un ambiente adecuado para su crecimiento y desarrollo y es por ello que continuamente deben hacer frente a las distintas situaciones de estrés que les impone el entorno.

Cuando hablamos de estrés nos referimos a la presencia de un factor externo a la planta que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo óptimo (Azcon-Bieto, 1993). Las condiciones de estrés a las que se ven sometidas las plantas pueden ser de tipo biótico o abiótico. El estrés biótico se refiere a las adversidades causadas por acción de seres vivos, como animales, hongos, bacterias y otras plantas. El estrés de tipo abiótico es causado por sequía, anegamiento, salinidad, temperaturas extremas (calor, frío, congelamiento), disponibilidad de luz, presencia de metales pesados en el suelo, contaminantes ambientales como NO₃, SO₂, ozono, etc. Es importante destacar que en determinadas situaciones las plantas pueden estar sometidas simultáneamente

a distintas situaciones de estrés, como es el caso de las plantas que crecen en ambientes desérticos, donde la falta de precipitaciones está acompañada de temperaturas elevadas.

En el transcurso de la evolución, las situaciones de estrés a las que fueron sometidas las plantas han provocado una presión de selección que les permitió desarrollar diversos mecanismos de defensa para poder adaptarse, evitando o tolerando situaciones adversas, y así lograr sobrevivir. La tolerancia o sensibilidad a los distintos tipos de estrés depende del genotipo y del estado de desarrollo de la planta. Las estrategias que utilizan las plantas para adaptarse a dichas situaciones incluyen cambios anatómicos, estructurales y bioquímicos, muchos de los cuales son comunes a los distintos tipos de estrés, mientras que muy pocos son específicos para un tipo en particular.

Dentro de las respuestas comunes podemos citar la modificación del patrón de crecimiento, senescencia y abscisión de órganos, reparación de proteínas desnaturalizadas y activación de mecanismos antioxidantes. Debido a que muchas de las respuestas son comunes, las rutas de transmisión de señales que se activan también son idénticas o similares.

5.1. Señalización del estrés

Cuando una planta está frente a una situación de estrés inicia una serie de acciones que culminan en la manifestación de una respuesta. Esta secuencia de acciones comienza con la percepción del estímulo estresante, continuando con el procesamiento y transmisión de la señal percibida a través de una cascada o rutas de transmisión hacia el núcleo de las células, donde se induce la activación o represión de la transcripción de genes que darán la respuesta adecuada.

Los llamados elicitores (previamente definidos) son los compuestos químicos encargados de sensar el estrés. Las fitohormonas son los principales metabolitos implicados en la transmisión intracelular de las señales de estrés, ya que presentan características que las hacen apropiadas para este fin, como

por ejemplo: pueden acumularse y desaparecer rápidamente, inducen la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en las respuestas y adaptaciones a condiciones adversas o en la recuperación posterior cuando desaparece la situación de estrés, o al incorporarlas en forma exógena en condiciones no estresantes incrementan la tolerancia de las plantas sometidas a situaciones desfavorables.

Entre las principales fitohormonas implicadas en respuestas a condiciones de estrés medioambiental se encuentran el ácido abscísico (ABA), el etileno y el ácido jasmónico (AJ). Las auxinas, citoquininas o poliaminas también lo están, pero con menor frecuencia.

El ABA incrementa su síntesis en situaciones de estrés hídrico. Esta hormona detecta la señal de falta de agua en la raíz y transmite estímulos hacia la parte aérea generando respuestas fisiológicas típicas del estrés. Se sintetiza fundamentalmente en los cloroplastos. Uno de los mecanismos que inducen la biosíntesis de ABA se debe a los cambios de volumen y turgencia experimentados por la célula. El aumento en su concentración en la hoja como respuesta a un estrés hídrico causa el cierre de estomas, disminuye la transpiración e inhibe el crecimiento de la planta y el desarrollo de las semillas y los frutos. También participa en la transmisión de señales de estrés junto al etileno y el AJ.

La síntesis de etileno es inducida por la deficiencia de hierro, heridas, temperaturas extremas, déficit hídrico, salinidad, hipoxia, acumulación de metales en el suelo y ataque de patógenos.

Las distintas situaciones adversas inducen la expresión de genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de compuestos fenólicos, en especial los fenilpropanoides, dando lugar a cumarinas, ácido salicílico, ácidos cinámicos como el cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, entre otros compuestos.

Ejemplos de metabolitos secundarios implicados en procesos de estrés abiótico:

- *Radiación UV: Flavonoides (antocianinas, flavonas y flavonoles), ácido salicílico, ésteres de ácidos fenólicos.* Los flavonoides absorben las radiaciones

UV ejerciendo un importante efecto fotoprotector al actuar como filtro de las radiaciones dañinas. Estos pigmentos se localizan generalmente en las células epidérmicas protegiendo los tejidos internos. El espectro de radiación UV se divide en radiaciones UV-A de baja energía (320 a 400 nm), radiaciones de alta energía UV-B (280-320 nm) y UV-C (254-280 nm), siendo las radiaciones UV-B y UV-C las que provocan daños mayores. Este tipo de radiación afecta la fotosíntesis, transpiración, polinización y provoca daños en el ADN. Las radiaciones UV estimulan la síntesis no sólo de estos pigmentos sino también de los carotenoides (terpenoides).

Los fenilpropanoides también pueden actuar como filtros de radiación UV. Se determinó asimismo que una mezcla de flavanonas (tres hidroxiformas o dihidroflavonoles), flavonas y flavonoles ubicados dentro de la vacuola central de las células epidérmicas de las hojas actúan como filtros de radiaciones UV-B y UV-A.

Las plantas superiores presentan fotorreceptores específicos, como por ejemplo los citocromos que también intervienen como protectores de la radiación UV-B. Estos fotorreceptores regulan la biosíntesis de pigmentos antociánicos.

- *Adaptación a cambios de temperaturas*: La aclimatación a la temperatura es un proceso que involucra cambios en la estructura y función de las membranas celulares, expresión de genes, contenido de agua de los tejidos, proteínas, lípidos y metabolitos secundarios.

En *Brassica napus* L. var oleífera el estrés por bajas temperaturas aumenta la expresión de la enzima PAL, acumulándose compuestos fenólicos. Durante la aclimatación al frío la quercetina actúa como antioxidante, secuestrando especies reactivas del oxígeno. En condiciones de heladas, los flavonoides actúan como estabilizantes de las membranas celulares.

- *Sequía*: El estrés hídrico induce cambios en la composición de flavonoides. En hojas de *Citrus clusii* Dunal, se han identificado la epigallocatequina y epicatequina gallato (Figura 31). Estos flavonoides son responsables de

cambios morfológicos en las hojas y son eficientes antioxidantes ayudando a inhibir la peroxidación de lípidos de membrana y a prevenir el estrés oxidativo. Se acumulan también poliaminas como espermina y espermidina (Figura 32); carotenoides, antocianinas y betalaínas.

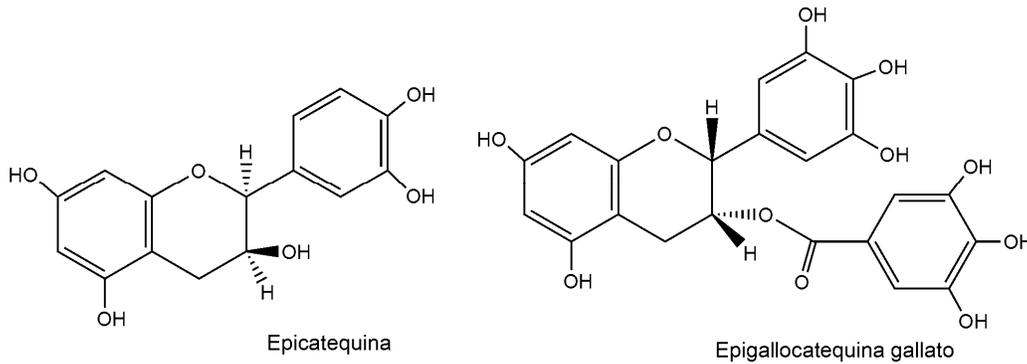


Figura 31. Estructura de algunos flavonoides inducidos por estrés hídrico

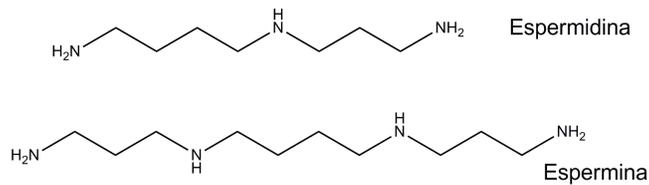


Figura 32. Poliaminas inducidas por estrés hídrico

- **Salinidad:** El estrés salino es producto de una concentración elevada de cloruro de sodio y sulfato de sodio en la solución del suelo que provoca en las plantas distintos efectos a través de mecanismos osmóticos e iónicos. La tolerancia de los cultivos a la salinidad es de carácter complejo. Las especies más tolerantes suelen acumular compuestos orgánicos con función osmoprotectora como prolina y glicina-betaína (Taiz y Zeiger, 2010).

Como respuesta a las altas concentraciones de sales en el suelo, las plantas pueden incrementar la concentración de alcaloides y flavonoides a fin de moderar el daño oxidativo. Un mecanismo de las plantas que crecen en hábitats ricos en sulfato es la síntesis de flavonoides, los cuales se unen a este anión.

- *Ozono*: Algunas especies pueden acumular ácido salicílico y ésteres de ácidos fenólicos.

- *Deficiencia de nutrientes*: Las plantas con deficiencias en fósforo suelen presentar hojas rojizas como resultado del aumento en la síntesis de antocianinas. Bajo deficiencia de hierro y nitrógeno se acumulan ácidos fenólicos y flavonoides, respectivamente.

- *Heridas*: como respuesta al estrés oxidativo se acumulan ésteres de ácidos fenólicos y cumarinas, mientras que compuestos como lignina y suberina actúan como barrera a la entrada de patógenos.

El uso de plantas tolerantes a distintos tipos de estrés abiótico podría permitir el aprovechamiento y la recuperación de tierras afectadas por salinidad, acidez, sequía, etc.

6. Estrategias de biocontrol de plagas y enfermedades basadas en el empleo de productos naturales vegetales

En los sistemas agrícolas más avanzados se utilizan pesticidas orgánicos sintéticos desde la década del '50, tanto para uso como insecticida, fungicida, bactericida y herbicida. La mayoría de los plaguicidas de origen químico se acumulan en los suelos causando contaminación, toxicidad para muchas formas de vida por su baja biodegradabilidad y dan origen a generaciones de insectos y microorganismos resistentes (Céspedes y Alarcón, 2011). Estos inconvenientes han obligado buscar nuevas alternativas que permitan controlar microorganismos patógenos e insectos de manera acorde a una agricultura sustentable.

El conocimiento de los mecanismos de defensa de las plantas, la identificación y determinación de las propiedades de los metabolitos secundarios junto con la mejora de las técnicas de extracción y aislamiento resulta de suma utilidad para el desarrollo de estrategias de biocontrol de plagas y enfermedades con biocidas de bajo impacto ambiental que sustituyan a aquéllos de origen sintético.

La búsqueda está orientada a la obtención de productos con actividad selectiva, que no generen resistencia y con adecuada biodegradabilidad, condición con la que cumplen la gran mayoría de los metabolitos secundarios vegetales. A estas condiciones debiera agregarse que el producto sea de disponibilidad asegurada o potencialmente capaz de ser producido a costos razonables para los sistemas agrícola-ganaderos a utilizarse.

A pesar de los avances logrados en la dilucidación de las estructuras químicas de los metabolitos secundarios queda mucho por estudiar en relación a sus propiedades químicas y biológicas.

Como ya se ha visto en los capítulos anteriores, los compuestos químicos encontrados en las plantas pueden establecer distintas relaciones planta-planta, planta-microorganismo o planta-insecto, siendo las reacciones planta-insecto las que mejor han sido estudiadas.

Dentro del área de la biotecnología agrícola las líneas de investigación más importantes acerca de estos temas son las siguientes: desarrollo de plantas genéticamente mejoradas con mayor resistencia a virus, bacterias, hongos, insectos y herbicidas; mapeos genómicos de los principales cultivos; obtención de plantas transgénicas para producción de metabolitos secundarios; reemplazo de agroquímicos por productos naturales como biofertilizantes, bioinsecticidas, bioherbicidas, control biológico de plagas y enfermedades. Estos últimos, a pesar de ser productos naturales, deben ser utilizados con la misma precaución que los pesticidas químicos, debiendo cumplir con las mismas exigencias en cuanto a normas de seguridad alimentaria y medioambiental que los pesticidas sintéticos.

Los primeros agroquímicos utilizados fueron polvos o extractos de plantas, los que a partir de la primera mitad del siglo XX fueron reemplazados por el surgimiento de los compuestos químicos de síntesis.

Durante el siglo XIX se identificaron algunos alcaloides como la nicotina (Figura 33), extraídos del tabaco (*Nicotiana tabacum*, *N. rustica* y *N. glauca*: *Solanaceae*), aislada en 1828 por Posselt y Rotschy y sintetizada en 1904 por Pictet y Rotschy (Matsumura, 1975). Este compuesto era utilizado para el control de insectos masticadores y chupadores de plantas comestibles. Debido

a su efecto tóxico para mamíferos, su utilización como producto fitosanitario es limitada. Actualmente se utiliza en preparaciones complejas bajo la forma de sulfato, en soluciones alcalinas o con jabones y como fumigante en aerosol de contacto en invernaderos. Un alcaloide de estructura similar a la nicotina, la anabasina (Figura 33), presenta mayor sensibilidad de acuerdo a la especie. Para el pulgón *Aphis rumicis* es más tóxica que la nicotina mientras que las larvas de los mosquitos son menos sensibles.

Otro alcaloide, la rianodina (Figura 33) ($C_{26}H_{37}NO_9$) aislada de la especie *Ryania (Liliaceae)* es más tóxico para mamíferos y su toxicidad para el barrenador del maíz y de la caña de azúcar (*Pyraustia nubilalis*) es comparable al DDT (Dicloro Dimetil Tricloroetano, insecticida organoclorado). La veratrina (Figura 33) extraída de *Veratrum album* se utilizaba para controlar pulgones del grosellero (*Pteronues ribedii*).

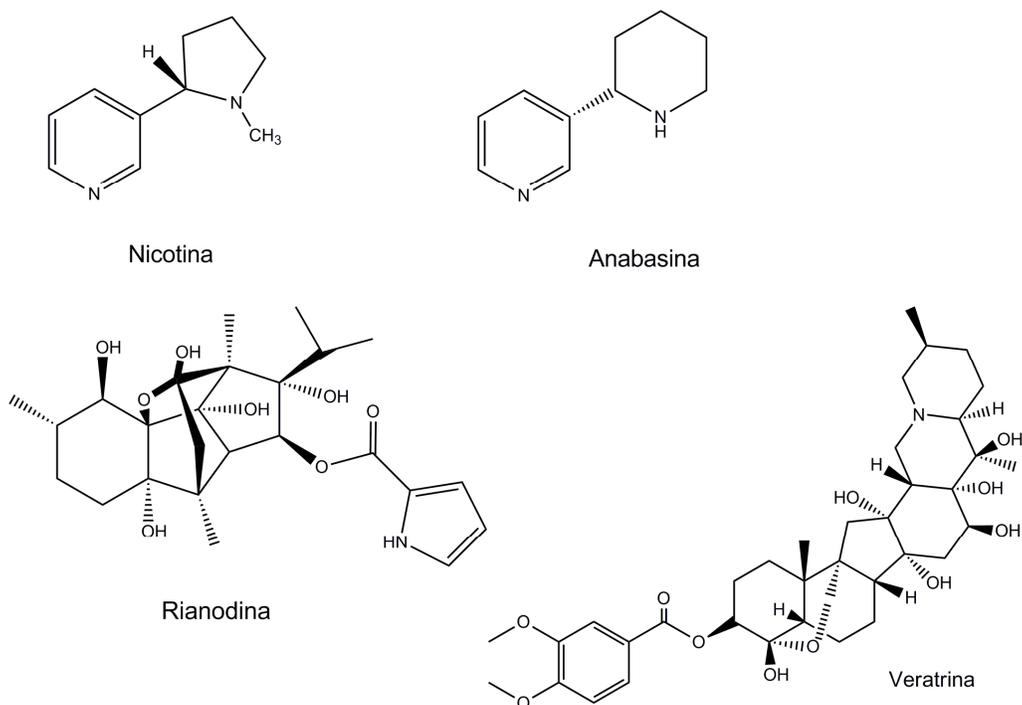


Figura 33. Alcaloides con actividad insecticida

Entre los compuestos fenólicos, los polifenoles son metabolitos con alto potencial de aplicación en la formulación de biopesticidas ya que además de

participar en diferentes procesos fisiológicos de las plantas juegan un papel importante en la protección vegetal. Como se mencionó anteriormente, se pueden oxidar enzimáticamente para producir quinonas tóxicas, refuerzan las paredes celulares actuando como barrera física para el parásito o impidiendo la difusión de sus toxinas. La mayoría de estos compuestos son solubles en agua reduciendo su permanencia en el ambiente.

Un derivado flavonoide, constituye el principio activo de la rotenona (Figura 34), un activo insecticida. Este compuesto se extrajo de las raíces de *Derris elliptica* (Matsumara, 1975). A diferencia de la nicotina, no sólo actúa sobre el sistema nervioso sino también sobre los mecanismos de respiración celular. Tiene la ventaja de ser inofensiva para animales de sangre caliente y altamente tóxica para los de sangre fría. En los últimos años ha ganado interés para su uso en agricultura biológica combinada con piretrinoides, sulfuros o cobre.

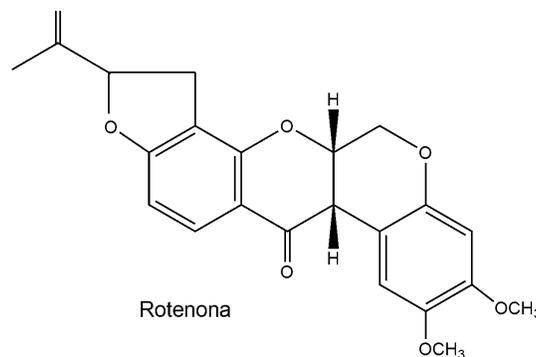


Figura 34. Insecticida derivado de flavonoides

La ingeniería genética estudia la inducción de genes que codifican la síntesis de fitoalexinas. Rüdiger Hain *et al.*, en 1993 junto con la empresa Bayer y universidades alemanas insertaron el gen de la estilbeno sintasa, proveniente de la vid, en plantas de tabaco transgénico, permitiendo que esta especie adquiriera una mayor resistencia a la infección producida por el hongo *Botrytis cinerea*. En el laboratorio de Brian McGonigle, de la compañía Du Pont, se logró la síntesis constitutiva de un glicósido del isoflavonoide “daidzeína”, un miembro de las fitoalexinas de leguminosas, en células de plantas de maíz, una monocotiledónea. El gen introducido, que codifica la síntesis de la enzima isoflavona sintasa, provenía de la soja, una dicotiledónea.

A pesar de las intensas investigaciones sobre productos naturales e interacciones químicas plantas-insecto, sólo dos nuevos tipos de insecticidas botánicos han sido comercializados en los últimos 15 años con cierto éxito. Son aquéllos basados en extractos de semillas de Nim (*neem* en inglés) (*Azadiracta indica*) y aquéllos basados en varios aceites esenciales (Isman *et al.*, 2011).

El *Nim* es uno de los insecticidas que ha tenido más éxito en los últimos años desde el punto de vista científico y comercial. Su principal principio activo es un triterpeno (limonoide) derivado de la azadiractina (Figura 35) aislado de las semillas y hojas del árbol *Azadiracta indica*, que actúa como repelente de plagas, afectando diferentes fases del crecimiento de los insectos. También existen informes de control en nematodos. El efecto ocurre a los 2 ó 3 días cuando los insectos se van o dejan de alimentarse y mueren. Su amplio espectro y elevada selectividad favorece a los enemigos naturales de los parásitos y a los polinizadores y resulta inocuo para mamíferos y el medio ambiente. La producción de extractos de Nim de calidad es costosa siendo la mayor parte de la producción de granos dedicada a la obtención de insecticidas. El aceite de Nim se puede utilizar en cultivos hortícolas, ornamentales y frutales para el control de larvas de lepidópteros, moscas blancas, áfidos y chinches.

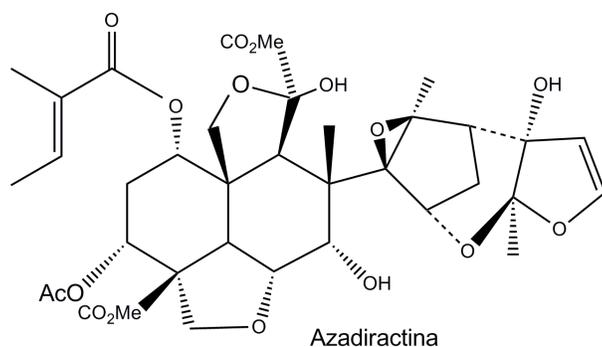


Figura 35. Insecticida de origen vegetal. Principio activo del Nim

Asimismo se encuentran con un mercado incipiente otros insecticidas botánicos, como el producto comercial producido a partir de extractos de *Quassia amara* (“Hombre Grande”) (Fam. *Simaroubaceae*), que presenta varios

cuasinoides como principios activos con actividad insecticida (Ocampo y Díaz Rojas, 2006). Los cuasinoides, de los cuales los cuantitativamente más importantes son la cuasina y alfa y beta neocuasina (Figura 36), son moléculas triterpénicas modificadas.

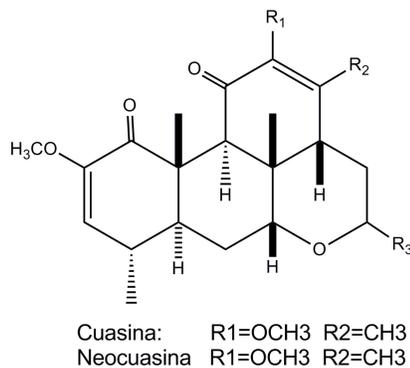


Figura 36. Principios activos insecticidas aislados de *Quassia amara*

Los aceites esenciales han sido usados desde la antigüedad en aplicaciones medicinales, cosméticas, insecticidas, bactericidas, como antiparasitarios y en otras aplicaciones útiles al hombre. Actualmente son utilizados principalmente por las industrias farmacéuticas, cosméticas, perfumísticas y alimenticias, entre otras.

Ensayos físico-químicos *in vitro* caracterizan a varios de ellos como antioxidantes. Sin embargo, trabajos recientes sobre células eucariotas muestran que pueden actuar como pro-oxidantes afectando las membranas y organelas como las mitocondrias. Ejercen efectos citotóxicos para células vivas pero usualmente no genotóxicos (adjetivo aplicado a cualquier sustancia capaz de causar daños al ADN que pueden conducir a la transformación de células hasta formar un tumor maligno). En algunos casos, cambios en el potencial redox intracelular y disfunciones mitocondriales inducidos por los aceites esenciales pueden estar asociados con su capacidad de ejercer efectos antígenotóxicos. Un papel importante en estas funciones son atribuidas al sinergismo entre los componentes de los aceites esenciales (Bakkali *et al.*, 2008).

Muchas investigaciones demuestran actividades biológicas de varios aceites esenciales como larvicidas, antialimentarios, repelentes, inhibidores del

crecimiento de insectos, de la fertilidad y oviposición, antifúngicos, antibacterianos y otras que los hacen ser considerados como una alternativa en el control de plagas y enfermedades. Además hay referencias sobre su rápida degradación en el ambiente lo que favorece a insectos benéficos (Tripathi *et al.*, 2009).

Jaensen *et al.* (2006) mencionan que la actividad repelente sobre varios insectos aparece asociada a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos de los aceites esenciales. La mencionada actividad ha sido demostrada con monoterpenos como el limoneno, citronelol, citronelal, alcanfor, α -pineno y timol (Ibrahim y Zaki, 1998; Yang *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005) y con sesquiterpenos como el β -cariofileno (Jaensen *et al.*, 2006).

En ensayos realizados en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP con aceites esenciales obtenidos a partir de materiales cultivados y procesados en la Institución, se han obtenido resultados alentadores sobre algunas actividades biológicas de interés agronómico.

Mezclas de aceite de laurel (*Laurus nobilis*) y lemongrass (*Cymbopogon citratus*) resultaron interesantes como herramienta para el control de mosca blanca en lechuga (Ringuelet *et al.*, 2010). Se obtuvieron mejores resultados con la mezcla que con el uso de los aceites en forma individual, lo que podría deberse al sinergismo observado en otros ensayos.

El *C. citratus* también resultó efectivo para el control de los pulgones *Brevicoryne brassicae* L. y *Myzus persicae* Sulz. en repollo (Ringuelet *et al.*, 2005a); el aceite de laurel (*Laurus nobilis*) para *M. persicae* (Padín *et al.*, 2006). El cineol, extraído del aceite esencial de laurel, mostró muy buena actividad repelente para los pulgones *M. persicae* y *B. brassicae* en repollo (Ricci *et al.*, 2010).

El aceite de *Lippia alba* mostró actividad sobre varios insectos plaga como *Haematobia irritans* (mosca de los cuernos en vacunos) (Ringuelet y Artiñano, 2013), gorgojos en granos almacenados, con actividades distintas según el quimiotipo ensayado (Ringuelet *et al.*, 2005b; Pesce, 2006).

Gorgojos como *Sitophilus oryzae* resultaron muy resistentes a la aplicación de varios aceites ensayados, mientras que *Tribolium castaneum* fue muy sensible al tratamiento con aceite de romero, *Rosmarinus officinalis* (Padín *et al.*, 2000). Actividades antimicrobianas interesantes de varios aceites esenciales fueron demostradas en trabajos *in vitro* e *in vivo*. Aceites de lemongrass (*C. citratus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) resultaron efectivos contra la bacteria *Paenibacillus larvae*, el agente causal de la enfermedad conocida como “loque americana” en abejas melíferas (Alippi *et al.*, 1996). Varios aceites fueron evaluados para el control de esta enfermedad, con resultados variables según dosis y formulaciones (Albo *et al.*, 2003). Para el control del hongo *Ascosphaera apis*, responsable de la enfermedad conocida como cría yesificada en abejas, se obtuvieron resultados alentadores con varios aceites esenciales, aunque con cierta toxicidad para la abeja adulta (Albo *et al.*, 2010).

Debido a la insolubilidad en agua de los aceites esenciales, un problema en el desarrollo de plaguicidas basados en estos productos es conseguir una adecuada formulación, estable y de fácil aplicación. Otra característica a tener en cuenta de estos metabolitos, es que al ser productos naturales su composición es variable de acuerdo con todos los factores que influyen en ella, como material de origen, condiciones de cultivo, de postcosecha y de extracción. Por esta razón es importante desde el punto de vista industrial conseguir una estandarización y/o normalización del producto a utilizar.

La disponibilidad de materia prima para la extracción de los aceites es otro factor a tener en cuenta a la hora de promover su uso como agroquímicos. En el caso de especies silvestres deben realizarse paralelamente trabajos de domesticación de las mismas. Éstos comprenden ensayos sobre técnicas de cultivo para optimizar el rendimiento, lograr estandarización del producto, proteger el germoplasma y la especie, todas acciones compatibles con un desarrollo sostenible de los recursos.

Otros estudios iniciados en la Argentina investigan las propiedades insecticidas y nematocidas de extractos de *Melia azedarach*, *Meliaceae* (Mareggiani *et al.*, 1998), de lactonas sesquiterpénicas aisladas a partir de especies de *Asteraceae* (Sosa *et al.*, 1995) y de un grupo de lactonas esteroidales aisladas

de las *Solanaceae*, los salpicrólidos cuya actividad para el control de herbívoros era hasta el momento desconocida (Mareggiani *et al.*, 2000).

Otros compuestos químicos naturales con actividad insecticida son las piretrinas (Figura 37) (ésteres del ácido crisantémico) aislados de las flores de la especie *Crysanthemum cinerariaefolium* (piretro), familia *Asteraceae*, también aisladas de otras especies de *Crysanthemum*. El principio activo “piretro”, consiste en una mezcla de ésteres de piretrinas I y II, cinetrina I y II y jasmolina I y II, donde las piretrinas son las más abundantes. Es uno de los insecticidas botánicos más antiguos del mundo.

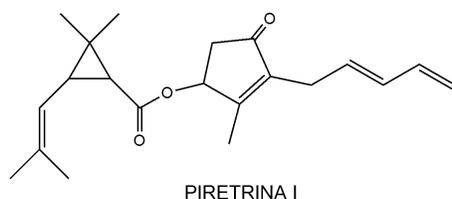


Figura 37. Estructura química de la piretrina I

La piretrina es activa aún en bajas concentraciones, es de amplio espectro, rápido efecto de choque, rápida degradación en el ambiente por radiación solar lo que limita su utilización en exteriores, mínima toxicidad para mamíferos, está homologada y aprobada para agricultura biológica. Es usada para combatir plagas en alimentos almacenados, contra insectos de cultivos industriales, dirigido a larvas adultas de lepidópteros y otros insectos fitófagos de vida libre, siempre y cuando parte de su ciclo biológico pueda estar expuesto a la acción de contacto del producto. Si bien se han detectado irritaciones y manifestaciones alérgicas en el hombre, su inestabilidad a la luz, aire y humedad reduce los riesgos en su utilización.

Tomando como base su estructura molecular, se desarrollaron los piretroides, insecticidas de síntesis con mayor estabilidad en el medio ambiente y mayor toxicidad para insectos y peces, los cuales son ampliamente utilizados en la agricultura y a nivel hogareño.

Los compuestos azufrados también suelen tener efecto insecticida. Entre las especies ensayadas se encuentran los extractos de *Allium*, que contienen

tiosulfatos, el arbusto *Boscia senegalensis* (*Capparidaceae*) cuyas hojas liberan isotiocianato de metilo. Estas moléculas han sido probadas como fumigantes en sistemas de almacenamiento de granos (Regnault *et al.*, 2004) a pesar de ello no se conoce con certeza su modo de acción. Algunos estudios han comprobado que actuarían a nivel del sistema nervioso, ya sea inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa o influyendo en los canales de potasio.

Los nematodos fitopatógenos ocasionan graves problemas en la agricultura a nivel mundial motivo por el cual se realizan numerosos estudios para su control. A gran escala se utilizan variedades resistentes, enmiendas orgánicas³, cultivos intercalares, rotaciones de cultivos con el objetivo de rebajar el potencial de infección del suelo. Entre las plantas utilizadas con estos fines se encuentran algunas variedades de mostaza blanca (*Sinapis alba* cv. Emergo) y rábano (*Raphanus sativus*) utilizados como abono verde. Distintas variedades de tagetes (*Tagetes patula* y *T. erecta*) son conocidas como eficaces nematicidas utilizadas como cultivos intercalares y como enmiendas. También se han probado el ricino (*Ricinus communis*), la albahaca (*Ocimum basilicum*), el Nim (*Azadirachta indica*), entre otras.

Los avances en el área de la química, fitoquímica y genética permitirán el aprovechamiento de las sustancias semioquímicas⁴ en el manejo sustentable de la agricultura.

Notas

¹ Rizósfera: volumen de suelo adyacente a las raíces en el que existen una amplia gama de sustancias exudadas al suelo que favorecen la actividad microbiana. Normalmente ocupa entre unos cuantos milímetros o algunos centímetros a partir de la raíz.

² Xenobióticos: compuestos químicos sintetizados por el hombre, ajenos o extraños a los organismos vivos. Su producción se ha incrementado en los últimos años y, dado que sus estructuras químicas no son reconocidas por las enzimas degradativas existentes, muchos se convierten en contaminantes que alcanzan niveles ambientales sumamente elevados.

³ Enmienda orgánica: productos naturales aportados al suelo para mejorar las propiedades físico-químicas, que liberan nitrógeno y otros minerales que las plantas pueden utilizar.

⁴ Semioquímicos: Los semioquímicos (del griego *semeon*, una señal) son productos químicos que sirven de intermediarios en las interacciones entre organismos.

Bibliografía

- Akiyama, K.; Matsuzaki, K.; Hayashi, H. (2005). "Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi". *Nature* 435:824-827.
- Albo, G.; Henning, C.; Ringuélet, J.; Reynaldi, F.; De Giusti, M.; Alippi, A. (2003). "Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees". *Apidologie* 34, 417-427.
- Albo, G.; Henning, C.; Reynaldi, F.; Ringuélet, J.; Cerimele, E. (2010). "Dosis Letal Media (DL₅₀) de algunos aceites esenciales y biocidas efectivos para el control de *Ascosphaera apis* en *Apis mellifera* L.". *REDVET. Revista electrónica de veterinaria*. 11(10).
- Alippi, A.; Ringuélet, J.; Cerimele, E.; Ré, M.S.; Henning, C. (1996). "Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease". *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 4 (2), 9-16.
- Attaran, E.; Zeier, T.E.; Griebel, T.; Zeier J. (2009). "Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*". *The Plant Cell*. 21: 954-971.
- Azcón, R. (2000). "Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola". In: *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mundi-Prensa, Mexico. 15 pp.
- Azcon Bieto, J.; Talon, M. (1993). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Madrid: Interamericana.

- Bago, B.; Pfeffer, E.; Shachar-Hill, Y. (2000). "Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas". *Plant Physiology*. 124: 949-958.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). "Biological effects of Essentials oils – A review". *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.
- Bonfante, P.; Genre, A.; Faccio, A.; Martini, I.; Schauser, L.; Stougaard, J.; Webb, J.; Parniske, M. (2000). "The *Lotus japonicus* *LjSym4* gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells". *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13: 1109-1120.
- Boué, S.M.; Wiese, T.E.; Nehls, S.; Burow, M.E.; Elliott, S.; Wientjes, CH.; Shih, B.Y.; McLachlan, J.A.; Cleveland, T.E. (2003). "Evaluation of estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(8): 2193-2199.
- Bryant, J.P.; Reichardt, P.B.; Clausen, T.P. (1992). "Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals". *J. Range Manage* 45: 18-24.
- Céspedes, C.; Alarcón, J. (2011). "Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de *Celastraceae*, *Rhamnaceae* y *Scrophulariaceae*". *BLACMA* 10 (3), 175-181.
- Collinge, D.B.; Gregersen, P.; Thordal-Christensen, H. (1994). "The induction of gene expression in response to pathogenic microbes". In *Mechanisms of plant growth and improved productivity: Modern approaches*. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p 391-433.
- Cruickshank, I.A.M.; Perrin, D.R. (1960). "Isolation of a Phytoalexin from *Pisum sativum* L.". *Nature*. 187: 799-800.
- Davies, F.; Calderón, C.; Huaman, Z. (2005). "Influence of flavonoid (Formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru". *Scientia Horticulturae*, 106 (3): 318-329.
- De la Vega, R.; Gutiérrez, M.; Sanz, P.C.; Calvo, R.; Robredo, L.; De la Cuadra, C.; Muzquiz, M. 1996. "Bactericide like effect of *Lupinus* alkaloids". *Industrial Crops and Products*. 5: 141-148.

- Duke, S.O.; Scheffler, B.E.; Dayan, F.E.; Weston, L.A.; Ota, E. (2001). "Strategies for using transgenes to produce allelopathic crops". *Weed Technol.* 15: 826–834.
- Duncan, A.J.; J.A. Milne. (1989). "Glucosinolates". In: Association of Applied Biologists (Ed.) *Aspects of Applied Biology 19. Antinutritional factors, potentially toxic substances in plants*. Institute of Horticultural Research, Wellesbourne, Warwick CV35 9EF, U.K. pp. 75-92.
- Einhellig, F. A. (1995). "Mechanism of action of allelchemicals in allelopathy". In *Allelopathy: Organisms Processes, and Application*. Inderjit, Dakshini, K.M.M., and Einhellig, F. A. Eds., ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, Washington, D.C. p: 96-116.
- Espinosa-García, F.J.; Langenheim, J.H. (1991). "Effects of some essential oil phenotypes in coastal redwood on the growth of several fungi with endophytic stages". *Biochemical Systematics and Ecology*. 19: 629-642.
- Garcia-Mateos, R.; Pérez-Leal, P. (2003). "Fitoalexinas: Mecanismos de defensa de las plantas". *Revista Chapingo*. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Universidad Autónoma Chapingo. Mexico. 9: 5-10.
- Genre, A.; Chabaud, M.; Timmers, T.; Bonfante, P.; Barker, D. (2005). "Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *M. truncatula* root epidermal cells before infection". *Plant cell*. 17: 3489-3499.
- Gilchrist, D.G. (1998). "Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide". *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414.
- Grayer, R.J.; Harborne, J.B. (1994). "A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993". *Phytochemistry* 37: 19-42.
- Guerra Sierra, B.E. (2008). "Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible". *Tecnología en marcha*. 21:191-201.
- Hammerschmidt, R. (1999). "Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens". *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 77-84
- Harborne, J.B. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry* (Fourth Edition). Academic Press, London. 318 pp.

- IAS (Internacional Allelopathy Society). First World Congress on Allelopathy: A science for the future. Cádiz, Spain, 1996.
- Ibrahim, J.; Zaki, Z.M. (1998). "Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malasyan Plants". *ASEAN. Rev. Biod. Environ. Conserv. (ARBEC)*. 6: 1-7.
- Isman, M. B.; Miresmaillí, S.; Machial, C. (2011). "Comercial opportunities for pesticides based on plant Essentials oils in agriculture, industry and consumer products". *Phytochem Rev.* 10: 197-204.
- Jaensen, T.; Palsson, K.; Borg-Karlson, A. (2006). "Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau". *J. Med. Entomol.* 43: 113-119.
- Leicach, S.R. (2006). "*Alelopatía: interacciones químicas en la comunidad y defensa de plantas*". 1.^a ed. Bs. As. Eudeba. 208 pp.
- Mandal, S.M.; Chakraborty, D.; Dey, S. 2010. "Phenolic acid act as signaling in plant-microbe symbioses". *Plant Signal Behav.* 5(4): 359-368.
- Mandelbaum, C.I.; Piche, Y. (2000). "The role of root exudates in arbuscular mycorrhiza initiation". *Mycorrhizal Biology*. p 153-172.
- Mansfield, J.W. (1983). "Antimicrobial compounds". In: Callow (ed.). *Biochemical Plant Pathology*. John Wiley and sons: N. Y. USA p 237-263.
- Mareggiani, G.; Leicach, S.; Laner, P. (1998). "Toxicidad de extractos que contienen metabolitos secundarios de distintos órganos de *Melia azedarach* al nematodo del nudo de la raíz". *Rev. Asoc. Latinoam. Fitopat.* 33 (2):122-126.
- Mareggiani, G.; Picollo, M.I.; Zerba, E.; Burton, G.; Tettamanzi, M.C.; Benedetti-Doctorovich, M.O.V.; Veleiro, A.S. (2000). "Antifeedant activity of withanolides from *Salpichroa origiganifolia* on *Musca domestica*". *Journal Nat.Prod.* 6 3(8): 1113-1116.
- Matsumura, F. (1975). "Botanical insecticides". In F. Matsumura. (ed.). *Toxicology of insecticides*. Plenum Press, New York. p 94-98.
- Mauch-Mani, B.; Métraux, J.P. (1998). "Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack". *Ann. Bot.* 82: 535-540.
- Molisch, H., Der (1937). "*Einfluss eine Pflanze auf die andere: Allelopathie*". Jena: Gustav Fischer, 106 pp.

- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2002) "*Microbiología e bioquímica do solo*". Lavras: Universidade Federal de Lavras, 625 pp.
- Muller, K. O.; Borger, H. (1941). Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*- Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biolog. Anstalt.* (Reichsanst) Berlin. 23: 189- 231 pp.
- Muller, C.H. (1969). "Allelopathy as a factor in ecological process". *Vegetatio* 18: 348-357.
- Ocampo Sanchez, R.; R. Díaz Rojas. (2006). "*Cultivo, conservación e industrialización del Hombre Grande (Quassia amara)*". San José de Costa Rica: Ed. Bougainvillea S.A.
- Ordeñana, K. M. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas.* Costa Rica. 63: 22-32.
- Padín, S.; Ringuelet, J.; Dal Bello, G.; Cerimele, E.; Ré, M. S.; Henning, C. (2000). "Effect of essential oils on mortality and repellence of stored-grain insects." *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants.* 7 (4): 67-73.
- Padín, S.; Kahan, A.; Ricci, M.; Ringuelet, J.; Henning, C.; Catalano, P.; Sceglio, P. (2006). "Actividad biológica del aceite esencial de *Laurus nobilis* L. sobre *Myzus persicae* Sulz. (Hemíptera: *Aphididae*) en repollo". En Resúmenes de las XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, (pp. 413). Catamarca: Gobierno de Catamarca.
- Park, B.; Choi, W.; Kim, J.; Lee, S. (2005). "Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents". *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 21: 80-83.
- Paxton, J.D. (1981). "Phytoalexins: a working redefinition". *Phytopathology* Z.101:106-109.
- Pesce, G. (2006). "Estudio de *Lippia alba* como especie aromática". *Trabajo Final de carrera.* Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP.
- Pieterse, C.M.; van Loon, L.C. (1999). "Salicylic acid-independent plant defence pathways". *Trends Plant Sci.* 4(2): 52-58.
- Popoff, O. (2008). *Beinofungi: Micorrizas*. En línea: <<http://www.fai.unnc.edu.ar>>.

- Powell, K. A.; Beardsomon, A. J.; Naylor, T. W.; Corcoran, E. G. (1983). "The microbial treatment of cyanide waste". *I. Chem. E. Symposium Series N.º 77*: 305-313.
- Ramírez Gómez, M., Rodríguez, Alia. 2012. "Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14: 271-284.
- Rask, L.; Andreasson, E.; Ekbohm, B.; Eriksson, S.; Pontoppidan, B.; Meijer, J. (2000). "Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae". *Plant Mol. Biol.* 42: 93-113.
- Regnault-Roger, C.; Philogene, B.; Vincent, C. (2004). *Biopesticidas de origen vegetal*. 1ra ed., Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España, pp. 305-316.
- Requena, N.; Mann, P.; Hampp, R.; Franken, P. (2002). "Early Developmentally Regulated Genes in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus Mosseae*: Identification of GmGin1 a Novel Gene with Homology to the C-terminus of Metazoan Hedgehog Proteins". *Plant soil* 244: 129-139.
- Rhoades, D. F. (1979). "Evolution of plant chemical defense against herbivores". In: Rosenthal G.A., Janzen D.H (eds). *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York, pp. 3-54.
- Ricci, M.; Padín, S.; Henning, C.; Ringuelet, J.; Kahan, A. (2010). "Cineol para el manejo integrado de *Myzus persicae* y *Brevicoryne brassicae* en repollo". *Bol. San. Veg. Plagas*, 36: 37-43.
- Rice, E.L. (1974). *Allelopathy*. Academic Press: New York, 353 pp.
- Ringuelet, J.; Henning, C.; Kahan, A.; Ricci, M.; Padín, S.; Catalano, P. (2005a). "Actividad tóxica del aceite esencial de "lemongrass" *Cymbopogon citratus* Stapf. sobre *Brevicoryne brassicae* L. y *Myzus persicae* Sulz. en plantas de repollo". En SFL (eds), Resúmenes de la V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, (pp 51). Montevideo: SFL.
- Ringuelet, J.; Cicció, J.; Ocampo, R.; Henning, C.; Padín, S.; Cerimele, E.; Urrutia, M. (2005b). "Repelencia y mortalidad de la esencia de *Lippia alba* sobre *Tribolium castaneum*". En SFL (eds), Resúmenes de la V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, (pp 50). Montevideo: SFL.

- Ringuelet, J.; Urrutia, M. I.; Henning, C. (2010). "Biological activity of essential oils on *Bemisia tabaci*". En ALAEQ (eds.), Abstracts of 1st. Latin American Meeting of Chemical Ecology. (pp 147). Colonia del Sacramento, Uruguay: ALAEQ.
- Ringuelet, J.; Artiñano, E. (2013). "Efectos de *Lippia alba* sobre mosca de los cuernos en un modelo de experimentación". En Echeverri, F.; Rossini, C. (eds.). *Productos naturales contra parásitos externos del ganado bovino y ovino, tales como mosca de los cuernos y garrapatas* (pp 136-144). Chile: Universidad de Magallanes.
- Rüdiger Hain. (1993). Patent. Inventores: Hain; Rudiger (Langenfeld, DE), Reif; Hans-Jorg (Colonia, DE), Stenzel; Klaus (Duesseldorf, DE) APPL. N°: 08/127,097. Archivado: 24 De septiembre de 1993.
- Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. H.; Willits, M. G.; Molina, A.; Steiner, H-Y; Hunt, M.D. (1996). "Systemic acquired resistance". *The Plant Cell* 8: 1009-1819.
- Ryder, T. B.; Hedrick, S. A.; Bell, J. N.; Liang, X.; Clouse, S.D.; Lamb, C. J. (1987). "Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme CHS in *Phaseolus vulgaris*". *Mol. Gen. Genet.* 210: 219-233.
- Scervino J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassells, R.; Vierheling, H.; Ocampo, J.A.; Godeas, A. (2005). "Flavonoids exclusively present in mycorrhizal roots of white clover exhibit a different effect on arbuscular mycorrhizal fungi than flavonoids exclusively present in non-mycorrhizal roots of white clover". *J. Plant Interact.* 15: 22-30.
- Senanayake, U. M.; Lee T. H.; Wills R. B. H. (1978). "Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils". *J. Agric. Food Chem.* 26: 822-824.
- Senevivatne, G.I.; Harbone, J.B. (1992). "Constitutive flavonoids and induced isoflavonoids as taxonomic markers in the genus *Vigna*". *Biochemical Systematics and Ecology.* 20: 459-467.
- Smith, S. D.; Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis.* (ed 3). Academic Press.

- Smith, S. E.; Gianinazzi-Pearson, V. (1988). "Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhiza plants". *Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 221-244.
- Sosa, M. E.; Tonn, C. E.; Guerreiro, E.; Giordano, O. S. 1995. "Toxicidad de lactonas sesquiterpénicas sobre larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)". *Revista Soc. Entom. Arg.* 54: 83-88.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5th ed). Sunderland, USA. Sinauer Associates.
- Tripathi, A.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P. (2009). "A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management". *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(5): 52-63.
- van Etten H. D; Mantthews, D. E.; Mantthews, P.S. (1989). "Phytoalexins Detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications". *Annual Review Phytopathology.* 27: 143-164.
- van Etten H. D.; Sandrock, R. W.; Wasman, C. C.; Sorby, S. D.; Mc Cluskey, K.; Wang, P. (1995). "Detoxification of phytoanticipins and phytoalexin by phytopathogenic fungi". *Canadian J. Bot.* 73: 518-525.
- van Loon, L. C.; van Kammen, R. T. (1970). "Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun NN'. Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus". *Virology* 40: 199-211.
- Yang, Y.; Lee, H.; Lee, D.; Ahn, Y. (2004). "Repellency of aromatic medicinal plant extracts and a steam distillate to *Aedes aegypti*". *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 20: 146-149.