

ENZIMAS HIDROLÍTICAS DETECTADAS EN CULTIVO FILTRADO DE *Septoria tritici* (Teleomorfo, *Mycosphaerella graminicola*)

C.A. CORDO¹ y L.R. MARECHAL²

¹ Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires. Cátedras de Fitopatología y Cerealicultura, Facultad de Agronomía, U.N.L.P., Calle 60 y 118; C.C. 31, 1900, La Plata, Pcia Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

Investigación desarrollada en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"

Aceito para publicación em: 01/11/89.

SUMMARY

HIDROLITIC ENZYMES DETECTED IN FILTRATES CULTURE OF *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*)

Tests to detect activity of hydrolitic enzymes (pectic and cellulolitic) were carried out to study their production by *Septoria tritici* and assert their effect on wheat leaf blotch. The fungus was cultivated in a liquid medium; and the culture filtrate was partially purified. Enzymatic activity was measured by reading viscometrical reductions and detecting free reducing groups as products of reaction. Constitutive character of cellulolitic enzymes and the adaptive one of pectic enzymes were determined. Both enzymes acted on wheat leaf blotch.

Key words: Pectic, cellulolitic, wheat leaf blotch.

RESUMO

ENZIMAS HIDROLÍTICAS DETECTADAS EM FILTRADO DE *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*)

Uma série de testes foram conduzidos para verificar a atividade de enzimas hidrolíticas (pécticas e celulolíticas) produzidas por *Septoria tritici* bem como avaliar seus efeitos em folhas de trigo. Para tanto *S. tritici* foi cultivada em meio líquido, sendo o filtrado parcialmente purificado. Uma atividade enzimática foi detectada através da medição da redução da viscosidade na mistura da reação ou da determinação dos grupos reduzidos livres com produtos da reação. O carácter constitutivo das enzimas celulolíticas ou adaptativas das enzimas pécticas foi determinado. As duas enzimas atuaram na mancha de folha do trigo.

Palavras-chave: Péctica, celulolítica, mancha do trigo.

INTRODUCTION

Septoria tritici causa necrosis en hojas de trigo. En infecciones tempranas puede afectar

las hojas basales y formar manchas irregulares y alargadas de 1,5 x 4,15 mm. longitud. En estados más avanzados del desarrollo del cultivo, son afectadas la hoja bandera y/o inferiores.

condiciendo al detrimento de la calidad del grano (WIESE, 1977). El principal mecanismo de penetración del hongo es el estomático, aunque también se observa penetración directa (HILU & BEVER, 1957). El posterior desarrollo miceliar es predominantemente intercelular (HILU & BEVER, 1957 loc.cit; COVEY, 1962; CORDO & MARECHAL, 1988) debiendo participar un sistema enzimático complejo, degradante del cemento celular y paredes. ALBERSHEIM et al. (1969) propuso que en alguna etapa de la patogénesis por hongos y bacterias, hay una interacción entre el patógeno y los hidratos de carbono del hospedante, determinando la habilidad del primero para producir enzimas capaces de degradar la pared celular del vegetal. MAGRO (1984) demostró que *Septoria nodorum* es capaz de producir poligalacturonasa, xilanasa y celulasas in vitro e in vivo y sugiere la función de las mismas en el proceso de invasión del hospedante.

Se estableció la presencia de enzimas celulolíticas producidas en cultivo por el aislamiento LH5 de *S. tritici*. Esto se evidenció por un estudio histológico en corte transversal de hoja inyectada con dicho filtrado y a través de las reacciones comparativas de daño con otras celulasas (CORDO & MARECHAL, 1988). En este último estudio se concluyó que el filtrado de cultivo de *S. tritici* produjo daño cuando se inyectó o topicó; que para cada caso la respuesta se dió en distinto tiempo y a través de distinta manifestación, aunque se observó un denominador común, que fue su acción sobre la pared celular. Se sugirió también, la participación de por lo menos, las enzimas celulolíticas en la formación del "Síntoma de la mancha de la hoja" y su colaboración en el proceso patológico.

Las enzimas pécticas facilitan el desarrollo intercelular del patógeno en el hospedante y proveen al primero de nutrientes a partir del tejido infectado (BATEMAN & MILLAR, 1966). WOOD (1960) estableció que el efecto de las enzimas pectolíticas en enfermedades

foliares ha sido poco estudiado; no obstante el patógeno se dispersa por el tejido parenquimático en extensiones variables a través de un sistema de enzimas pécticas.

Las pectinas, conjuntamente con otros polímeros, constituyen parte fundamental del cemento intercelular. Las endo-poligalacturonasas (endo PG, EC 3.2.1.15) y endo-pectato-liasas (endo PAL, EC 4.2.2.1) rompen los ligamientos α -1,4 glicosídico en ácidos pécticos al azar, desorganizando los tejidos de plantas (WOOD, 1960; PILNIK & ROMBOUST 1979; BATEMAN & MILLAR, 1966, ISHII, 1976).

La pared celular primaria contiene además un porcentaje apreciable de celulosa y hemicelulosa ligadas a pectinas. Existen enzimas específicas que inician el proceso de maceración por ruptura de estos ligamientos (BROWN, 1976) sumándose también la participación de distintos tipos de celulasas (WOOD, 1960; LI et al., 1965).

El efecto de las enzimas celulolíticas en la producción del síntoma de la mancha de la hoja ha sido citado (MALCOM, 1978), no obstante, aún no se ha estudiado la participación de las enzimas pécticas.

El propósito de este estudio fue explorar la producción de las enzimas hidrolíticas por parte del patógeno y relacionarlas como coadyuvante en la formación del síntoma de la mancha de la hoja.

MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con dos aislamientos de *S. tritici* de distinta virulencia: 38388 C.D. (moderadamente virulento) y LH5 (baja virulencia). Los cultivos filtrados, para los ensayos enzimáticos se prepararon a partir de cultivos en medio líquido de Fries N° 3 con extracto de levadura al 0,3% (BOUSQUET & SCKAJENICOV, 1974) que crecieron durante 25 días a 18°C - 22°C y 12 Hs./O

bajo irradiación de luz cercana al ultravioleta y con aeración por agitación manual cada dos días. Para medir incremento de actividad pectinolítica y celulolítica y celulolítica relativa se reemplazó la sacarosa y extracto de levadura por 1% de ácido poligalacturónico o pectina de manzana o carboximetil celulosa sódica, respectivamente. Finalizando el crecimiento, los cultivos se filtraron por tela, se centrifugaron durante 10 min. a 10.000 RPM, utilizando el sobrenadante como fuente de enzima. El sobrenadante se liofilizó y se eliminaron las sales con una columna de Bio-Gel P6 (50-100 mesh) equilibrada con agua destilada. Las preparaciones se guardaron en congelador hasta el momento de ser ensayadas. Para detectar actividad enzimática se realizaron las siguientes reacciones:

1) Actividad de Poligalacturonasa (PG)

Se obtuvo midiendo la reducción de la viscosidad de una solución del 2% de pectinas de manzana como sustrato con un viscosímetro Fenske-Ostwald tipo 150. La mezcla de reacción contenía 2.5 ml pectina al 2%; 0,1 ml de 0.5M buffer citrato a pH 4.8; 2ml enzima llevando a 8 ml con agua destilada. Se emplearon 2 testigos (T1 y T2) como controles de actividad enzimática.

T1 = mezcla de reacción sin enzima: 5.4 ml de agua destilada; 0.1 ml de 0.5M buffer citrato a pH 4.8; 2.5 ml pectina al 2%.

T2 = 8 ml agua destilada

Las mediciones viscosimétricas (DESH-PANDE, 1960) se hicieron periódicamente, hasta 240 minutos de incubación a 35° C. Paralelamente se determinó el incremento en grupos reductores por el método Somoggi-Nelson (NELSON, 1964). Una unidad de enzima se define como micromoles de grupos reductores expresados en glucosa por hora por mg. de proteína o 1000 por la recíproca del tiempo en minutos necesarios para reducir el 50% de la viscosidad del sustrato a pH 4.8 y 35°C (BATEMAN, 1963).

2) Pectin-liasa

Los cultivos crecieron como se describió previamente y el medio se suplementó con 1% de pectina de manzana. La mezcla de reacción enzimática contenía: 0.1 ml pectina al 2%, pH 4.8; 0.3 ml de 0.02M tris-cl buffer a pH 8 suplementado con 0.001M Cl_2Ca ; 0.7 ml enzima en un volumen final de 2 ml. La mezcla de reacción se paró adicionando 0.2 ml de 9% $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mezclada bien y centrifugada a 10,000 RPM durante 10 minutos. Los cambios en absorbancia se registraron a 235 nm. Una unidad de enzima se definió a partir del cambio de 0.01 unidad de absorbancia en 1 hora por mg de proteína (NASUNO, 1975). Los cambios de absorbancia se registraron a 0,2 y 24 horas midiendo también poder reductor en esos intervalos de tiempo.

3) Pectato-liasa

La mezcla de reacción contenía :0.25 ml de 2% polipectato de Na a pH 4.3 ; 0.5 ml de 0.05M tris-ClH buffer pH 8.5 con 0.001M Cl_2Ca ; 1ml de enzima en un volumen final de 2ml. La actividad se midió en un espectrofotómetro Beckman D.U., como los cambios de absorbancia a 235 nm registrándolos a las 0,2 y 24 horas. Paralelamente, se realizó la medida de poder reductor para esos intervalos, cuando las condiciones de incubación fueron mayores de 4 hs, a la mezcla de reacción se le adicionó unas gotas de tolueno para evitar contaminación bacteriana.

4) Celulasa

La actividad se determinó por la disminución de la viscosidad de una solución al 2% de carboxi-metil-celulosa sódica (CMC) como sustrato. El viscosímetro usado fue F.O. tipo 300.

Las mediciones viscosimétricas se hicieron periódicamente hasta los 240 minutos a 35°C. Paralelamente se determinó el incremento en grupos reductores por el método de Somoggi-Nelson. La mezcla de reacción

contenía : 2.5 ml de carboximetil celulosa al 2% a pH 4.3; 0.1 ml de 0.5M buffer citrato a pH 4.8; 2 ml enzima en un volumen final de 8 ml. Se emplearon dos testigos (T1 y T2) como control de actividad enzimática.

T1 = mezcla de reacción sin enzima: 5.4 ml de agua destilada; 0.1 ml de 0.5M buffer pH 4.8; 2.5 ml carboximetil celulosa al 2% a pH 4.3.

T2 = 8 ml agua destilada.

La lectura se hizo en un espectrofotómetro Coleman a 520nm. Una unidad de enzima se define como micromoles de grupos reductores expresados en glucosa por hora por mg de proteína o 1000 por la recíproca del tiempo en minutos, necesarios para reducir el 50% de la viscosidad del sustrato a pH 4.8 y 35°C (BATEMAN, 1963).

Todos los ensayos fueron repetidos dos veces y en cada repetición, las mezclas de reacción se realizaron y midieron por

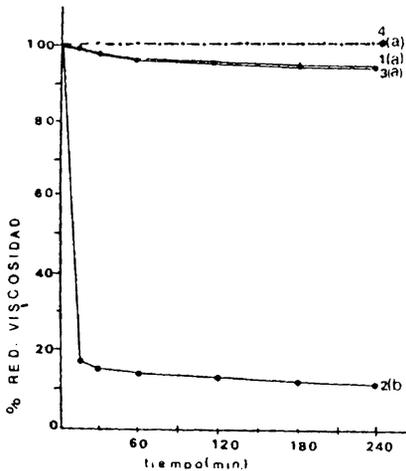
duplicado. La significancia se da a $P \leq 0.05$. La evaluación de la actividad enzimática se realizó considerando el porcentaje de reducción en viscosidad a través del tiempo y la medición del incremento en poder reductor. Los resultados están resumidos en Figuras 1 y 2.

RESULTADOS

Actividad de poligalacturonasa

No se hallaron diferencias entre cepas para los parámetros estipulados cuando el hongo creció en un medio completo sin inductor y con sacarosa como fuente de carbono. Así la cepa 38388 C.D. solo redujo un 3% la viscosidad del sustrato al cabo de 4 hs de actividad y alcanzó a producir 3.43 μmol glucosa reductora/mg proteína h. finalizando con 1.87 μmol glucosa reductora mg proteína al cabo de la cuarta hora. Igualmente, la cepa LH5

ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA



ACTIVIDAD DE CELULASA

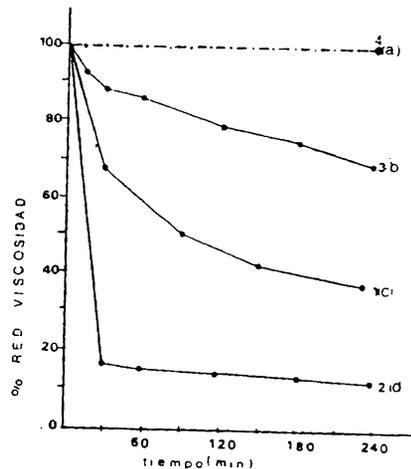


Figura 1, A y B: Porcentaje de reducción en viscosidad de la mezcla de reacción durante 240 min. Medición realizada con un viscosímetro Fenske-Ostwald tipo 150 o 300 (según viscosidad del sustrato) a 35°C. 1: cepa 38388 C.D. sin inductor; 2: cepa 38388 C.D. con inductor; 3: cepa LH5 sin inductor; 4: controles (T1, mezcla de reacción sin enzima; T2 agua destilada). Los puntos de los gráficos, seguidos por diferentes letras difieren significativamente al $P \leq 0.05$.

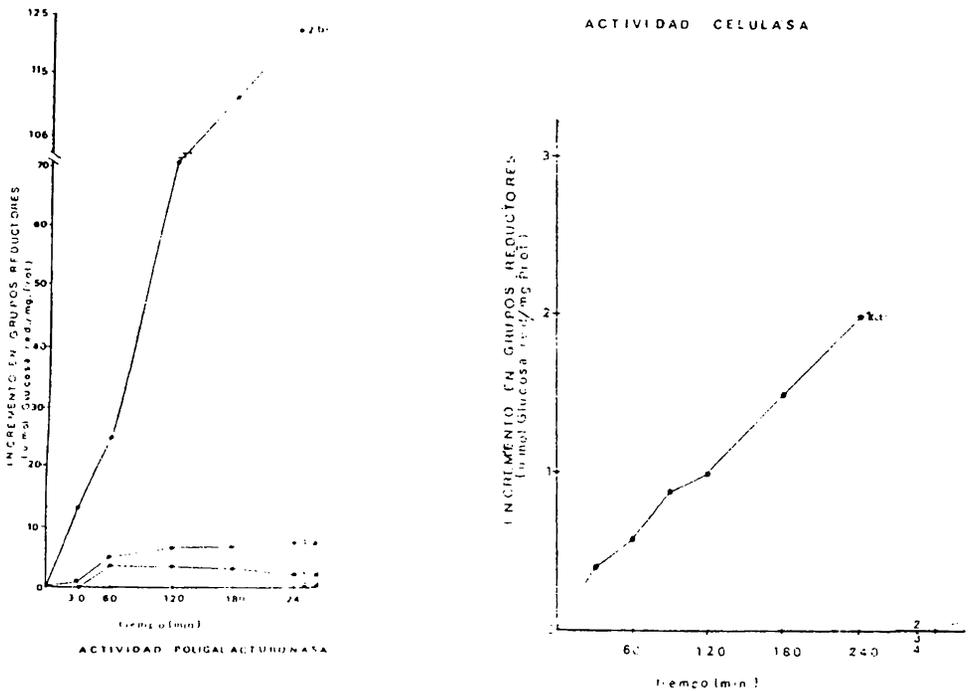


Figura 2, A y B: Actividad enzimática medida a través del incremento en grupos reductores por el método Somoggi-Nelson. Calculado sobre la base de los umoles de glucosa reductora liberados por mg prot./hora durante 240 min. 1: cepa 38388 C.D. sin inductor; 2: cepa 38388 C.D. con inductor; 3: cepa LH5 sin inductor; 4: controles; T1: mezcla de reacción sin enzima; T2 agua destilada). Los puntos de los gráficos seguidos por diferentes letras difieren significativamente al $P \leq 0.05$.

redujo también 3% la viscosidad del sustrato. para el mismo período de tiempo, alcanzando a producir 5 umol glucosa reductora mg proteína/h, finalizando con 7.08 umol glucosa red./mg proteína al cabo de la cuarta hora. En cambio, la actividad enzimática de la cepa 38388 C.D. sujeta a crecimiento con pectina como inductor fue muy destacada. Al cabo de 1 hora produjo 25 umol glucosa reductora mg proteína alcanzando al final de la cuarta hora a 121.7 umol glucosa reductora/mg proteína y reduciendo un 83% la viscosidad del sustrato. Por su parte, ambos controles no modificaron su viscosidad en el transcurso de las 4 horas. Tampoco fue necesario calcular el incremento en grupos reductores ya que no se produjo liberación de azúcares por falta de enzima en la mezcla de reacción. Estos resultados confirmarían la naturaleza inductiva de la

poligalacturonasa producida en cultivo por *S. tritici*.

Actividad de celulasa

La actividad de esta enzima se evidencia especialmente a través de la reducción de la viscosidad del sustrato. Se observa diferencia de actividad cuando las cepas crecen en medio completo sin inductor. La reducción en viscosidad del sustrato se vé casi triplicada al finalizar la cuarta hora de reacción (33% para 38388 C.D. y 13% para LH5). La actividad enzimática de la cepa poco virulenta alcanza un AR = 10.5 unidades. No obstante, cuando la cepa 38388 C.D. crece sujeta a inducción con CMC la reducción en viscosidad aumenta al 84% en la cuarta hora. De todos modos, los valores elevados de reducción en viscosidad del sustrato, evidenciado en las cepas no in-

ducidas, sugieren la naturaleza constitutiva de la celulasa.

Contrariamente a lo acaecido con la mezcla de reacción completa los controles (T1 y T2) no manifestaron reducción de la viscosidad ni liberación de azúcares reductores en el transcurso de las 4 hs de duración de la observación.

El tipo de celulasa producida por *S. tritici* no ha sido detectada por el método convencional de incremento en grupos reductores por Somoggi-Nelson. De ahí proviene la falta de resultados para las dos cepas creciendo con y sin inductor.

Actividad pectin-pectato-liasa

Bajo las condiciones ensayadas no se registró actividad de pectin-pectato liasa medida por absorbancia a 235 nm en los tiempos 0,2 y 24 hs. Los resultados provenientes de la liberación de grupos finales reductores para tiempos similares, no demostraron actividad por parte de estas dos enzimas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Muchos patógenos que producen enzimas degradantes de la pared celular también producen toxinas, ácidos orgánicos, reguladores del crecimiento que funcionan en conexión con estas enzimas durante la patogénesis. BATEMAN & BASHMAN (1976) han establecido que cuando un patógeno se enfrenta con las paredes celulares de un vegetal, ésta constituye una compleja barrera de polímeros con diferentes ligamientos químicos que requieren enzimas específicas para su degradación. Los patógenos han evolucionado de manera de reconocer la estructura química de la pared celular y elabora las enzimas apropiadas para dismantelar los constituyentes de la misma. Estos mismos autores han reconocido que los estudios *in vitro*, para reconocer la habilidad del patógeno, de producir enzimas en cultivo,

que degraden sustratos madres, son el primer paso para relacionar una enzima dada con el proceso patológico. Esta aproximación, que se intenta con este trabajo, guía estudios relacionados con la infección y la enfermedad.

En este trabajo se presentan resultados de la actividad *in vitro* de dos enzimas posiblemente involucradas en la patogénesis de la "mancha de la hoja del trigo": una endopoligalacturonasa y una celulasa del tipo β -1,4 glucan hidrolasa, obtenida en cultivo filtrado de *S. tritici*. El hongo debería reconocer la estructura química de la pared celular y elaborar enzimas apropiadas para hidrolizar sus constituyentes.

Se seleccionaron dos métodos sensibles para estimar actividad enzimática considerando la estructura química y el tipo de ligamiento entre polisacáridos. Estas son, pérdida de viscosidad de pectinas, ácidos pécticos (BELL et al., 1955) o formas sustitutas solubles de la celulosa (carboximetil celulosa) y la ruptura de ligamientos glicosídicos cuantificados en la determinación del incremento de grupos finales reductores. Las enzimas participantes son hidrolíticas. Las lecturas de absorbancia de los productos de reacción detectados a 520 nm sugieren su eliminación por hidrólisis, y las enzimas participantes hidrolíticas (ALBERSHEIM et al., 1960). Los constituyentes de la pared celular pueden servir de inductores efectivos de enzimas que degradan la misma pared (BATEMAN & BASHMAN, 1976). Algunos estudios realizados con cultivos del patógeno y paredes celulares aisladas, como única fuente de carbono, indican que las enzimas mencionadas fueron producidas en una secuencia temporal, en la cual, las enzimas pécticas aparecen primero y las que degradan xilosa y celulosa, aparecen después (ENGLISH et al., 1971; MULLEN, 1974; MAGRO, 1984).

En este estudio realizado con *S. tritici* se ha comprobado la actividad de la poligalacturonasa obtenida en cultivo fúngico con pec-

tina como fuente de carbono. Resultó ser una enzima iducible. Su actividad quedó demostrada por un incremento del 83% en el efecto de la reducción de la viscosidad y de más de 100 veces en los umoles de glucosa reductora/mg de proteína, eliminados al cabo de la cuarta hora de reacción.

CORDO & MARECHAL (1988) a través de un estudio histopatológico en corte transversal de hoja de trigo inyectada con filtrado y por reacciones comparativas de daño con otras celulasas, establecieron la participación de enzimas celulolíticas en el filtrado de cultivo de la cepa LH5 de *S. tritici*. A través del actual estudio, se corroboró la actividad de una celulasa, de naturaleza constitutiva, confirmando la suposición realizada por MAL.COM (1978). Se observó reducción de la viscosidad de la mezcla de reacción cuando intervino filtrado obtenido por crecimiento del hongo sin inductor (carboximetil celulosa). La actividad de la celulasa, producida por *S. tritici* parece pertenecer a la del tipo endo- β -1,4-D-Glucan 4- glucano hidrolasa. Es una endoglucanasa que inicia el ataque de la celulosa amorfa. Los productos finales mayores son celulodextrina y trazas de glucosa que no son detectadas sensiblemente por el método de Somoggi-Nelson. De ahí que no se halla visto un incremento importante del poder reductor en ninguna de las reacciones con las dos cepas mencionadas. Estos resultados están indicando ausencia de enzima celulasa del tipo β -1,4-D- glucan glucohidrolasa o exoglucanasa. Esta, de existir, completaría la hidrólisis a glucosa de los productos provenientes de la acción de las celulasas C1 y endoglucanasa (LI et al., 1965).

La actividad celulósica fue detectada accidentalmente al principio de esta investigación. El filtrado fúngico destruyó al cabo de dos horas a 4°C una bolsita de diálisis de acetato de celulosa.

La falta de actividad pectin-pectato liasa después de 24 hs de reacción podría explicarse por algunos factores:

a) porque el sustrato de crecimiento del hongo no fue favorable para inducir la producción de estas enzimas (BATEMAN & MILLAR, 1966). En *Rhizoctonia solani*, pectato-liasa es producida de manera favorable solo en medio de cultivo con hipocotile de poroto;

b) que el método empleado para detectarla no halla sido suficientemente sensible;

c) que las enzimas participantes en el proceso patológico no produzcan un efecto macerante, sino simplemente hidrolítico, (BELL et al., 1955; BYRDE & FIELDING, 1968; SUZUKI et al., 1967; DEAN & WOOD, 1967) que las pectin-pectato liasas están involucradas en el fenómeno macerante. La falta de actividad de estas, podría indicar que estas enzimas hidrolíticas no producen un fenómeno macerante. La falta de actividad de éstas, podría indicar que estas enzimas hidrolíticas no producen un fenómeno macerante comparable al producido por *Sclerotinia fructigena*, *Erwinia aroidea*, *E. caratovora*, *Sclerotium rolsfii*. (ALBERSHEIM et al., 1969).

El síntoma necrótico visualizado en estado avanzado de la enfermedad está relacionado con la muerte celular (HILU & BEVER, 1957). La degradación de la pared celular hospedante y la muerte celular, están asociadas con un aumento de la permeabilidad de la membrana, detectada en estados tempranos de la patogénesis, (FRIEDMAN & JAFFE, 1960; FOX et al., 1972; BYRDE et al., 1973). El daño del tejido tratado con enzimas pécticas se caracteriza por un aumento irreversible de la permeabilidad, por daño del plasmalema. Se han emitido varias hipótesis, para justificar el daño celular:

a) algún caracter específico de la molécula enzimática, responsable de la interacción tóxica (BASHAM & BATEMAN, 1975)

b) productos de reacción solubles, a partir de la reacción enzimática (FUSHLEY, 1957)

c) por interacción directa de las enzimas pécticas con un sustrato en o dentro del plasmalema (MOUNT & BATEMAN, 1970).

d) por falta de soporte mecánico del plasmalema, al producirse la pérdida de la pared celular (HALL & WOOD, 1973).

STEPHAN & WOOD, 1975; BASHAM & BATEMAN, 1975, sostienen la hipótesis que el daño y muerte celular están relacionados con el daño de la pared, por enzimas pécticas, y MAGRO (1984) demostró, que las enzimas degradantes de la pared celular fueron producidas por *S. nodorum* en vivo y en cultivo; sugirió su función en la invasión del hospedante, en conexión con o en lugar de compuestos tóxicos.

El presente trabajo aportó el conocimiento de la actividad de dos enzimas hidrolíticas producidas en cultivo filtrado de *S. tritici*. Dicha actividad fue detectada por reducción en la viscosidad del sustrato y por liberación de azúcares reductores.

Se trataría de dilucidar si sólo estas enzimas son las responsables de la expresión del síntoma o si se complementarían en la acción patogénica, algún otro metabolito químico.

LITERATURA CITADA

- ALBERSHEIM, P.; MUHLETHALER, K.; FREY-WYSSLING, A. Stained pectin as seen in the electro microscope. **A Biophys. Biochem. Cytol.**, **8**:501-06, 1960.
- ALBERSHEIM, P.; JONES, T.M.; ENGLISH, P.D. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. **Ann. Rev. Phytopath.**, **7**:171-94, 1969.
- BASHAM, Y.; YOKON, Y.; HENIS, Y. Detection of Cutinases and Pectic Enzymes During Infection to tomato by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Phytopathology**, **75**:940-45, 1985.
- BASHAM, Y. & BATEMAN, D.F. Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products. **Phytopathology**, **65**:141-53, 1975.
- BATEMAN, D.F. Pectolytic Activities of Culture Filtrates of *Rhizoctonia solani* and Extracts of *Rhizoctonia*. Infected Tissues of Bean. **Phytopathology**, **53**:194-204, 1963.
- BATEMAN, D.F. The enzymatic maceration of plant tissue. **Neth. J. Plant Pathol.**:**74**, suppl.:7-50, 1978.
- BATEMAN, D.F. & MILLAR, R.L. Pectic enzymes in tissue degradation. **Ann. Rev. Phytopath.**, **4**:119-46, 1966.
- BATEMAN, D.F. & BASHAM, H.G. Degradation of Plant Cells and Membranes by Microbial Enzymes. In: HERTEFUSS, R. & WILLIAMS, P.H., eds. **Physiological plant pathology**. encyclopedia of plant physiology. Berlin. Springer - Verlag, 1976. v.4, p.316-45.
- BELL, T.A.; ETCHELLS, J.L.; JONES, I.D. A method for testing cucumber salt stock brine from softening activity. Washington, US Dept. of Agriculture, 1955. p.72-75.
- BOUSQUET, J.F. & SCKAJENICOV, M. Isolation and mode of action of a phytotoxin produced by *S. nodorum* Berk. **Phytopathol. Z.** **80**:355-60, 1974.
- BROWN, W. Toxin and cell-wall dissolving enzymes in relation to plant diseases. **Ann. Rev. of Phytopathol.**, **3**:1-18, 1965.

12. BYRDE, R.J. & FIELDING, A.H. Pectin methyl-trans-eliminase as the maceration factor of *Sclerotinia fructigena* and its significance in brown rot of apple. *J. Gen. Microbiol.*, **52**:287-97, 1968.
13. BYRDE, R.J.; FIELDING, A.H.; ARCHER, S.A.; DAVIES, E. The role of extracellular enzymes in the rotting of fruit tissue by *Sclerotinia fructigena*. In: WIESE, M.V. **Compendium of wheat diseases**. St Paul, The American Phytopathological Society, 1977. p.106.
14. CORDO, C.A. & MARECHAL, L.R. Acción Tóxica de filtrados de *S. tritici*. *Rev. Fac. Agron. La Plata*, **63**:25-34, 1988.
15. DEAN, M. & WOOD, R.K.S. Cell wall degradation by a pectic transeliminase. *Nature*, **214**:408-10, 1967.
16. DESHPANDE, K.B. Studies on the Pectolytic Enzymes System of *Rhizoctonia solani* kuhn. IV. Viscosity Reducing Enzymes. *Enzymologia*, **22**(5):295-306, 1960.
17. ENGLISH, P.D.; JURALE, J.B.; ALBERSHEIM, P. Host - Pathogen interaction II Parámetros affecting polysaccharide degrading enzymes secreting by *Colletotrichum lindemutianum*. *Plant Physiol.*, **47**:1-6, 1971.
18. FRIEDMAN, B. & JAFFE. Effect of soft root bacteria and pectolytic enzymes on electrical conductance of witloof chicory tissue. *Phytopathology*, **50**:272-74, 1960.
19. FOX, R.T.V. & MANNERS, J.G. Ultrastructure of entry and spread of *Erwinia caratovora* var. *atroseptica* into potato tubers. *Potato Res.*, **14**:61-73, 1972.
20. FUSHLEY, S.G. Studies in the physiology of parasitism, XXIV. Further experiments on the killing of plant cells by fungal and bacterial extracts. *Ann. Botany*, **21**:273, 1957.
21. GARBER, E.D. BERAHA, L.; SHAEFFER, S.G. Genetics of phytopathogenic Fungi XIII. Pectolytic and cellulolytic enzymes of three phytopathogenic *Penicillia* *Bot. Gaz.*, **126**:36-40, 1965.
22. HALL, J.A. & WOOD, R.K.S. Permeability changes in tissue and other effects of cell-separating solutions from soft roots caused by *Corticium praticola* and *Erwinia atroseptica*. *Ann. Bot.*, **38**:129-40, 1974.
23. HANCOCK, J.G. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomatoe stem. *Phytopathology*, **56**:975-79, 1966.
24. HILU, H. & BEVER, W. Inoculation oversumming and susceptpathogen relationship of *Septoria tritici* on *Triticum* species. *Phytopathology*, **47**:475-80, 1957.
25. ISHII, S. Enzymatic Maceration of Plant Tissues by Endo-Pectin Lyase and Endo-Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. *Phytopathology*, **60**:281-89, 1976.
26. ISHII, S. & YOKOTSUKA, T. Maceration of Plant Tissues by Pectin-transeliminase. *Agric. Biol. Chem.*, **35**:1157-59, 1971.
27. LEAL, J.A. & VILLANUEVA, J.R. Lack of pectic enzymes production by non-pathogenic species of *Verticillium*. *Nature*, **195**:1328-29, 1962.
28. LI, L.; FLORA, R.M.; KING, K.W. Individual Roles of Cellulase Components Derived from *Trichoderma viride*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **111**:439-47, 1965.
29. MAGRO, P. Production of Polysaccharide-Degrading enzymes by *Septoria nodorum* in culture and during pathogenesis. *Plant Science Letters*, **37**:63-68, 1984.
30. MALCOM, H. A Host specific toxin extracted from *Septoria tritici* In: THE AUSTRALIAN SEPTORIA WORKSHOP, 1978. **Proceedings**. Wagga Wagga,

- Agricultural Research Institute, 1978. p.30-31.
31. MOUNT, M.S.D.; & BATEMAN, D.F. Induction of electrolytes loss tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endololygalacturonate transesterinase. **Phytopathology**, 60:924-31, 1970.
32. NASUNO, S. Pectin degradation by phytopathogenic and saprophytic bacteria. In: WORKSHOP ON PHYTOBACTERIOLOGY, I, Columbia, 1975. **Proceedings**. s.i. p.34-37.
33. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153:375-80, 1944.
34. PILNIK, W. & ROMBOUS, T.F.M. Pectic enzymes. In: BLANCHARD, J.M.V. & MITCHELL, J.R., eds. **Polysaccharides in food**. New York, Academic Press, 1979. p.105-25.
35. STEPHENS, S.J. & WOOD, R.K.S. Killing of protoplasts by soft-rot bacteria. **Physiol. Plant. Path.** 5:165-71, 1975.
36. SUZUKI, H.; ABE, T.; URADE, M.; NISIZAWA, K.; KURODA, A. Nature of the macerating enzymes from *Rhizopus* sp. **J. Ferment Technology**. 45:73-85, 1967.
37. WOOD, R.K.S. Pectic and cellulolytic enzymes in plant diseases. **Ann. Rev. Plant Physiology**, 11:299-322, 1966.