

Alteraciones fisiológicas e histoquímicas en arvejas atacadas por *Fusarium oxysporum* f. *pisi*¹

CLOTILDE JAUCH²

(Recibido : 10 de marzo de 1970)

RESUMEN

Se describen síntomas y alteraciones histológicas de plantas de arveja (Alaska 14 A y Cuarentona), infectadas experimentalmente con *Fusarium oxysporum* f. *pisi* (Lindford) Snyder et Hansen, raza 2.

Mediante el método de Grieve se comprobó que en los vasos de plantas sanas el colorante se eleva sin dificultad, en cambio en los vasos de plantas enfermas no hubo ascenso.

El tratamiento de cortes incluídos en parafina con el método de la hidroxilamina alcalina y el ácido férrico, previa metilación, ha permitido determinar la naturaleza péctica en la mayoría de los casos de las sustancias de los tapones en el interior de vasos de plantas enfermas y de los depósitos sobre las paredes internas de los vasos ; además los tapones y depósitos están constituídos por otras sustancias no identificadas.

Al estudiar la acción del filtrado de cultivos de *F. oxysporum* f. *pisi* raza 2 sobre los vasos xilemáticos se observó que los tapones contenidos en los vasos de plantas inoculadas experimentalmente son similares a los de los tallos de plantas de arveja que fueron tratadas durante uno, dos o cuatro días en ese líquido.

En el filtrado de cultivos del hongo se comprobó la presencia de pectin-metil-esterasas (PME). El examen cromatográfico determinó que el hongo sintetiza poligalacturonasas (PG). Es de hacer notar que también en cultivos con afrecho de trigo sintetiza PME y PG.

Por espectrofotometría, utilizando ácido tiobarbitúrico (TBA), se detectaron a pH 5.0 *trans*-eliminadas del ácido poligalacturónico y poligalacturonasas, mientras que a pH 8.0 sólo se detectaron *trans*-eliminadas, siendo la producción más activa a pH 5.0 que a pH 8.0.

SUMMARY

The symptoms and histological changes shown by pea plants (Alaska 14 A and Cuarentona) artificially infected with *Fusarium oxysporum* f. *pisi* (Lindford) Snyder et Hansen, race 2, are described.

By means of Grieve's method it was shown that in the vessels of healthy plants, the stain ascends freely, while it cannot in those of diseased plants.

Treatment with alkalin hydroxylamine and ferric acid previous methylation, to determine the nature of the plugs in the inner part of vessels of ill plants and of deposits on the internal walls of vessels showed that it was of pectic nature besides some other not determined substances.

When studying the action of filtrates of cultures of *F. oxysporum* f. *pisi* race 2 on the vessels, it was observed that the plugs included in the xylematic vessels of the artificially inoculated plants were similar to those of stems of peas submerged for periods of one, two or four days.

¹ Realizado con subsidio otorgado por CAFPTA (Comisión Administradora del Fondo para la Promoción de la Tecnología Agropecuaria) según Plan N° 124. Publ. N° 1. Presentado en el 1º Congreso Internacional de Patología Vegetal, Londres, 14-28 julio, 1968.

² Profesora titular del Departamento de Agricultura, orientación Fitopatología, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Buenos Aires.

In those filtrates, the presence of pectin-methyl-esterase (PME) was verified; chromatographic analyses showed that the fungus also synthesizes polygalacturonases (PG). A fact also seen in cultures with bran of wheat.

Spectrophotometry with thiobarbituric acid (TBA) established that at pH 5.0 it produced *trans*-eliminases of the polygalacturonic acid and polygalacturonases while at pH 8.0 only produced *trans*-eliminases although it was more active at pH 5.0.

INTRODUCCION

De acuerdo con el concepto de BOLLARD y MATTHEWS (1966) se considera como verdadero marchitamiento o "true wilt" a la enfermedad de la arveja, causada por *Fusarium oxysporum* f. *pisi* raza 2. Según estos autores el agente patógeno penetra por el sistema radicular a partir del suelo, pero prolifera sólo al llegar a los vasos xilemáticos, produciéndose entonces el marchitamiento y muerte de las plantas.

Numerosos investigadores han orientado sus esfuerzos al estudio de la fisiopatología del marchitamiento del tomate (LUDWIG, 1952; SCHEFFER y WALKER, 1953; GOTHOSKAR et al., 1955; PIERSON et al., 1955), pero en relación a la fisiopatología del marchitamiento de la arveja los antecedentes son escasos (WINSTEAD y WALKER, 1954).

LUDWIG (1952) atribuye el marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* a los tapones de constitución coloidal, que se encuentran en los vasos leñosos. SCHEFFER y WALKER (1953) demostraron que en plantas inoculadas con este hongo existe una retención de la corriente vascular que puede comprobarse mediante tinción. Todos los estados de marchitamiento indicaron que el taponamiento de vasos xilemáticos era la causa inmediata del marchitamiento y los efectos de filtrados del hongo fueron determinados en el sistema vascular de estacas de tomate. GOTHOSKAR et al. (1955) estudiaron el rol de enzimas (pectin-metil-esterasa y depolimerasa) en el desarrollo del marchitamiento del tomate por *Fusarium*. PIERSON et al. (1955) realizaron estudios histológicos de tapones vasculares formados en plantas naturalmente infectadas y en estacas de tomate tratadas con filtrados del *F. oxysporum* f. *lycopersici*, mencionando los cambios producidos en laminillas medias y la decoloración vascular.

Según WINSTEAD y WALKER (1954) las razas 1 y 2 de *F. oxysporum* f. *pisi* causan el oscurecimiento y el taponamiento de vasos de plantas de arveja, produciendo además "in vitro" pectin-metil-esterasa (PME) y poligalacturonasa (PG). PAVIZAS y AYERS (1966) comprobaron que *F. oxysporum* f. *pisi* raza 2-1 produce en una semana *trans*-eliminases del ácido poligalacturónico en un medio que contiene pectina y polipectato de sodio.

En plantas de arveja sanas se comprobó que las laminillas medias de las células del parénquima xilemático que rodean los vasos están intensamente coloreadas, lo que no sucede en tejidos enfermos. En éstos la laminilla media aparece incolora o poco coloreada. Esto hizo pensar en un posible ataque enzimático a la sustancia péctica de la laminilla media por enzimas pectolíticas producidas por el hongo. Para demostrarlo se realizaron los siguientes ensayos: 1) Acción de filtrados de cultivos de *F. oxysporum* f. *pisi* raza 2 sobre los vasos y 2) Determinación de las enzimas contenidas en estos filtrados.

MATERIALES Y METODOS

a) *Variedad de arveja*. Cuarentona y Alaska 14 A, sembradas en macetas de 14 cm de diámetro con arena gruesa y regadas periódicamente con solución de Hoagland (HOAGLAND y SNYDER, 1933).

b) *Fusarium oxysporum* f. *pisi*. Se utilizó una cepa de alta virulencia de *F. oxysporum* f. *pisi* (Lindford) Snyder y Hansen (Cepa Nº 170 del Instituto de Patología Vegetal del INTA).

c) *Raza fisiológica*. Se utilizaron las variedades diferenciales indicadas por DOLING (1964) para determinar la raza fisiológica de *Fusarium oxysporum* f. *pisi*.

d) *Medios de cultivo*.

1. Líquido: frascos Erlenmeyer de 250 ml con 75 ml del medio de Richard modificado (SCHEFFER y WALKER, 1953).
2. Sólido: frascos Erlenmeyer de 1.000 mililitros con 25 gramos de afrecho de trigo y 25 ml de agua destilada, esterilizados a 120° durante 20 minutos.

e) *Infección experimental.* Para preparar la suspensión del hongo se sembró en medio de Richard un trozo de 5 mm de la cepa de *Fusarium*, incubado a 28° durante 10 días, licuándose posteriormente durante 5 minutos con 50 cm³ de agua. Las raíces de plantas de arveja de 7 a 12 días fueron sumergidas en esta suspensión, siendo de inmediato transplantadas a sus macetas originales. La temperatura del invernáculo fue mantenida entre 24° y 27°.

f) *Testigos.* Las plantas testigo fueron removidas de la arena, sus raíces agitadas en agua estéril y colocadas nuevamente en su maceta original.

g) *Tratamiento de vasos del xilema con fucsina básica.* Para tratar los vasos de las plantas testigo y de las plantas enfermas se utilizó la técnica de GRIEVE (SCHEFFER y WALKER, 1953).

h) *Inclusiones en parafina.* Los tejidos de tallos y pecíolos fueron fijados en F.A.A. (formalina 4, ácido acético 3, alcohol etílico 43, agua destilada 50 p/v) durante 24 horas. Para la deshidratación e impregnación en parafina se siguió la técnica de ZIRKEL (RIKER y R. RIKER, 1936), con la modificación de que en lugar de alcohol terbutílico se utilizó butanol.

i) *Coloración de sustancias pécticas.* Se siguió la técnica de la hidroxilamina alcalina y el ácido férrico, previa metilación (Mc CREADY y REEVE, 1955; REEVE, 1959; GEE *et al.*, 1959; GRANITZ, 1962 y JAUCH *et al.*, 1965); también se utilizó el rojo de rutenio al 1/5.000 en agua destilada, teniendo en cuenta sin embargo que no es un colorante específico de sustancias pécticas.

j) *Preparación del filtrado de cultivos del hongo.* En cuatro frascos Erlenmeyer de 250 ml, con 100 ml de solución de Richard modificada, se sembró abundantemente el *Fusarium* (SCHEFFER y WALKER, 1953), incubando 15 días a 28°. Los cultivos se homogeneizaron en licuadora con 50 ml de agua y se filtró por Buchner, lavando el micelio tres veces con aproximadamente 30 ml de agua destilada estéril cada vez.

El micelio fue transplantado a frascos Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de solución de Czapeck e incubado a 28° (GOTHOSKAR *et al.*, 1955); luego de 24 horas, los cultivos en medio Czapeck fueron filtrados por Millipore HA o GS y el líquido recogido en frascos Erlenmeyer estériles de

125 ml. Este líquido se controló que no tenía presencia de gérmenes.

Las plantas sanas, cultivadas en arena (PIERSON *et al.*, 1955) con solución Hoagland, fueron arrancadas con sus raíces y éstas y 15 cm inferiores del tallo se colocaron en alcohol etílico a 95° durante 2 minutos. Luego se cortaron las raíces y se introdujo la extremidad del tallo de cada ejemplar (dejando algunas hojas) en el filtrado. Divididas las plantas en tres grupos, se emplearon uno, dos y cuatro días de inmersión para cada uno de los tres grupos de plantas respectivamente.

k) *Pectin - metil - esterasa.* La actividad de esta enzima fue determinada empleando el método de WOOD (1961).

l) *Determinación cromatográfica de poligalacturonasas.* Por cromatografía ascendente se detectó el ácido monogalacturónico derivado de la actividad enzimática sobre sustrato de pectina al 0,5 % (JAUCH *et al.*, 1964, 1965).

m) *Determinación espectrofotométrica de poligalacturonasas y de trans-eliminadoras del ácido poligalacturónico.* Según técnica de AYERS *et al.* (1966) efectuando la determinación con ácido tio-barbitúrico (TBA).

RESULTADOS

SÍNTOMAS EN PLANTAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

A. VARIEDAD ALASKA 14 A. Al cuarto día de la inoculación se insinuó una ligera epinastia, la que se observó en la mayor parte de las plantas inoculadas entre el quinto y el sexto día sobre todo en las dos hojas inferiores, siendo más intensa al séptimo día.

Al cuarto día hubo marchitamiento en la mitad de las plantas hasta la tercera hoja, incluida la estipula. Al sexto día el grado de marchitamiento aumentó y los síntomas comenzaron a aparecer en otras plantas, llegando a un 90 %. Se advirtió entonces pérdida de turgencia y un ligero tinte amarillento en 30 % de las plantas. El total amarillamiento se produjo al 13° día, avanzando este proceso poco a poco de abajo hacia arriba y muriendo las plantas entre los días 16° y 18°. Las nervaduras de las hojas superiores no se aclararon.

Se evidenció oscurecimiento de los tejidos vasculares (browning). Todas las plantas presentaron disminución en su crecimiento (stunting), midiendo sólo un tercio o hasta la mitad de la altura de las plantas testigo. Estas crecieron normalmente y sólo en pocos casos algunas de las hojas más inferiores aparecieron amarillentas.

B. VARIEDAD CUARENTONA. En esta variedad se evidenció falta total de epinastia y detención del crecimiento de las plantas, siendo muy notable la pequeñez de los folíolos, cuarta parte del normal, en relación con el testigo. El marchitamiento en esta variedad fue menos evidente que en Alaska 14 A y solamente se lo observó en los folíolos. Ya al sexto día de la inoculación, además del marchitamiento, algunos folíolos presentaron manchas amarillas. Las plantas mostraron una gran rigidez que se hizo muy evidente al séptimo día. Luego se redujo el tamaño pero no murieron.

OBSERVACION DE VASOS DEL XILEMA

Al emplear el método de coloración de GRIEVE se comprobaron obstrucciones en los vasos de plantas enfermas. En éstos la fucsina básica no pudo circular debido a los tapones y en consecuencia no se coloreó la cara interior de los vasos. En las plantas sanas el colorante ascendió sin dificultad. Cortes hechos con micrótopo de congelación permitieron observar dichos tapones.

NATURALEZA PECTICA DE LOS TAPONES

Se efectuó la inclusión en parafina de tallos y pecíolos de arvejas inoculadas, eligiendo secciones a diferentes niveles del tallo y comenzando por el cuello.

La mayor parte de los cortes histológicos presentó tapones más o menos grandes en el interior de los vasos xilemáticos (Fig. 1).

El tratamiento con hidroxilamina alcalina y ácido férrico permitió determinar la naturaleza pectica de las sustancias contenidas en los vasos y que adquirieron el tinte rojo característico de esta reacción (Fig. 1, A); la tonalidad roja a veces se encontró entremezclada con una amarillenta (Fig. 1, B) que corresponde a otras sustancias, probablemente gomas.

El rojo de rutenio dio evidente color rojo violáceo a la totalidad del tapón. Con este colorante

no se pueden diferenciar las sustancias pecticas de los depósitos de goma, ya que el rojo de rutenio colorea de rojo ambas sustancias.

En los vasos de las plantas enfermas se observaron depósitos más o menos espesos en sus paredes internas; en cambio los cortes de similares tejidos de plantas sanas no presentaron ninguna alteración en el lumen de los vasos apareciendo sus paredes netas. Las laminillas medias de las células del parénquima xilemático, que rodean los vasos de las plantas sanas, se mostraron intensamente coloreadas, mientras que por el contrario en los tejidos enfermos, se observó que la laminilla media era incolora o poco coloreada.

ACCION DEL FILTRADO DEL HONGO SOBRE LOS VASOS

Los tapones que presentaron los cortes de los vasos de plantas inoculadas experimentalmente, fueron similares a los tapones de tallos de arvejas colocados durante 24, 48 ó 96 horas en el filtrado. Naturalmente que la cantidad de sustancias adheridas a las paredes de los vasos, como así también la proporción de vasos semi o totalmente obturados, será tanto mayor cuanto más largo sea el tiempo que la extremidad inferior de los pequeños tallos permanezca sumergida en el filtrado.

En los preparados histológicos de tallos tratados 24 horas con el filtrado, se apreciaron, adheridos a las paredes de los vasos, algunos depósitos teñidos de rojo por el método de la hidroxilamina alcalina y el ácido férrico, previa metilación. En cortes efectuados después de 48 horas, esos depósitos fueron más considerables y se pudieron apreciar ya algunos tapones pecticos en el interior de los vasos. Los cortes microscópicos de tallos con 96 horas de tratamiento con el filtrado, mostraron una proporción mayor de tapones pecticos los que ocuparon total o parcialmente los vasos.

La laminilla media de las células del parénquima xilemático que rodea los vasos presentó una notable disminución en la intensidad de la coloración.

Los cortes de los testigos no presentaron ninguna anormalidad. Las laminillas medias aparecieron teñidas sea con hidroxilamina alcalina y ácido férrico, previa metilación, sea con rojo de rutenio; los vasos presentaban sus paredes netas y el lumen vacío.

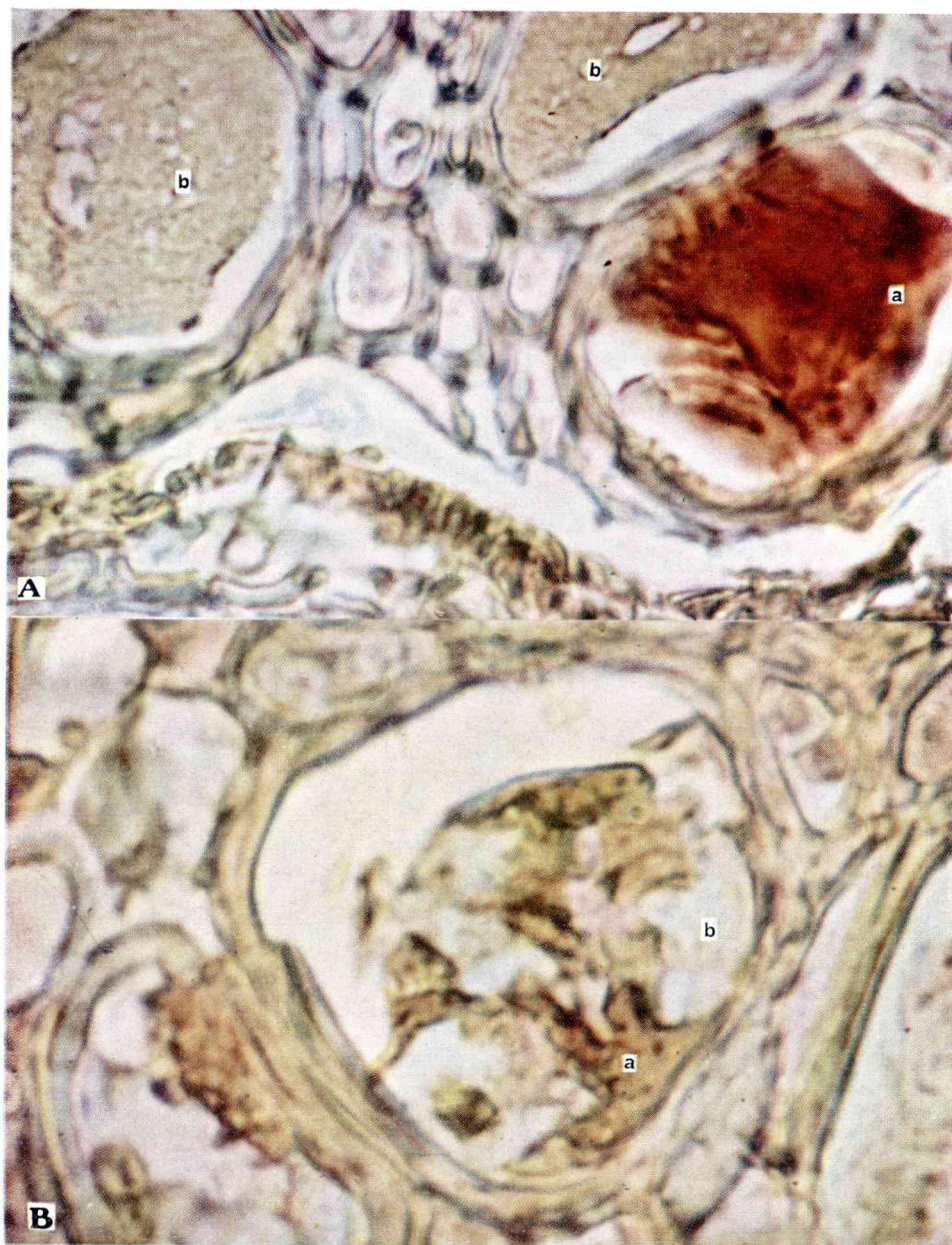


Fig. 1 -- Tapones en vasos xilemáticos de tallos de arveja previo tratamiento con hidroxilamina alcalina y ácido férrico. A, Tapón coloreado de rojo (a) constituido por sustancias pécicas. Los otros dos vasos (b) contienen tapones que no son de naturaleza pécica ($\times 1500$); B, En este tapón la tonalidad roja (a) está entremezclada con una amarillenta (b). La tonalidad roja es característica de sustancias pécicas; la amarillenta corresponde a otras sustancias, probablemente gomas ($\times 1500$).

PRODUCCION "IN VITRO" DE ENZIMAS
PECTOLITICAS

A. HIDROLASAS.

1. *Pectin-metil-esterasa*. Se examinó el filtrado del hongo, verificándose la presencia de pectin-metil-esterasa (PME).
2. *Poligalacturonasa*. Se pudo determinar que *F. oxysporum* f. *pisi* raza 2 sintetiza también poligalacturonasa, la que se manifestó por la aparición del ácido monogalacturónico detectado cromatográficamente.

También en medio de afrecho de trigo (JAUCH *et al.*, 1965) *F. oxysporum* f. *pisi* raza 2 sintetiza pectin-metil-esterasa y poligalacturonasa.

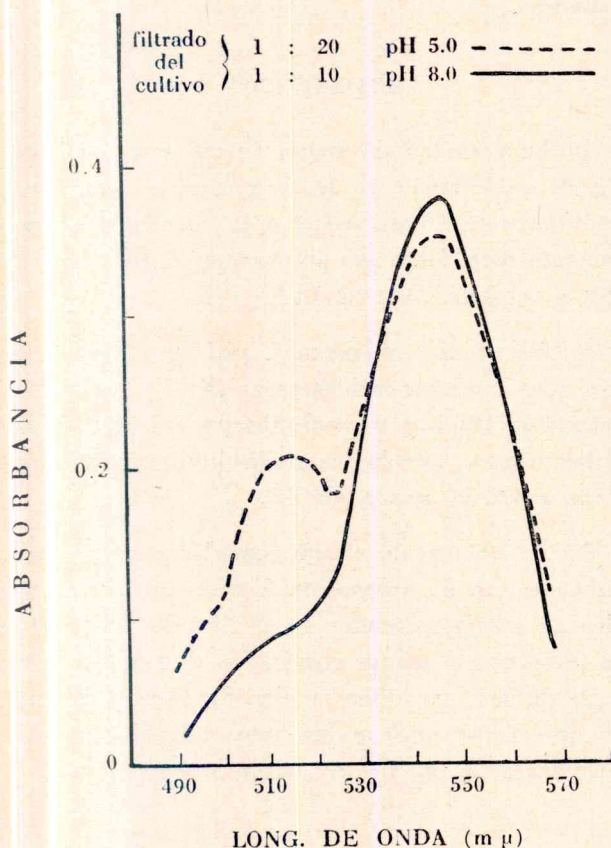


Fig. 2. — *Fusarium oxysporum* f. *pisi* raza 2. Espectro de absorción del producto resultante de la reacción con TBA a pH 5.0 y a pH 8.0. A pH 5.0 se observan dos picos máximos a 515 mμ (equivalente a la actividad de las poligalacturonasas) y a 545 mμ (equivalente a la actividad de las *trans*-elimininasas). A pH 8.0 la curva presenta un solo punto máximo a 545 mμ, es decir que el hongo sintetiza solamente *trans*-elimininasas.

B. *Trans*-ELIMINASAS.

Se ha podido comprobar, espectrofotométricamente, que el filtrado de cultivos del hongo contiene *trans*-elimininasas ("polygalacturonate *trans*-elimininasas") del ácido poligalacturónico.

Se pueden observar los resultados obtenidos en la figura 2.

El máximo de absorbancia está a 545 mμ, equivalente a la actividad de las *trans*-elimininasas.

En general las *trans*-elimininasas de los hongos tienen un pH óptimo de 8.0, pero las *trans*-elimininasas del hongo estudiado fueron más activas a pH 5.0. Esto confirma lo que se observa en las infecciones naturales de las arvejas por *F. oxysporum* f. *pisi*, que son más intensas en suelos ácidos que en alcalinos.

La curva (Fig. 2) a pH 5.0 se refiere a un filtrado diluido 1:20, mientras que el filtrado a pH 8.0 fue diluido a 1:10.

De la lectura de estos gráficos se puede apreciar también la presencia de poligalacturonasas a pH 5.0, siendo los productos que ellas forman absorbidos a la longitud de onda 515 mμ.

DISCUSION

De este trabajo se deduce que la infección experimental por *Fusarium oxysporum* f. *pisi* raza 2 determina la sintomatología característica de un verdadero marchitamiento (true wilt). En efecto la epinastia, la marchitez, el amarillamiento, la disminución del crecimiento y el oscurecimiento de los tejidos vasculares, se presentan en las plantas de arveja inoculadas experimentalmente.

En las dos variedades ensayadas, ALASKA 14 A y CUARENTONA, se observaron diferencias en los síntomas y su intensidad. Esto sucede por tratarse de dos variedades, una susceptible (ALASKA 14 A) y otra de mediana resistencia (CUARENTONA). Entre las seis variedades de arveja diferenciales para raza 2 de *F. oxysporum* f. *pisi*, ALASKA 14 A es una de las dos variedades susceptibles. La variedad CUARENTONA se cultiva con preferencia en la Argentina.

Entre los síntomas típicos de la enfermedad se ha prestado especial atención a la marchitez (wilting) y específicamente a uno de los dos mecanismos postulados para explicar ese síntoma, es decir, a los tapones que se forman en el interior de los vasos xilemáticos (tapones en plantas inocu-

ladas "ad hoc" y tapones en tallos tratados con filtrado del *Fusarium*). El otro mecanismo es el cambio en la permeabilidad de las hojas que estaría asociado con la producción de toxinas por el hongo.

La fucsina básica no puede circular por los vasos xilemáticos por cuanto están obstruidos debido a la formación de tapones, en consecuencia el colorante no puede teñir la cara interior de los mismos, contrariamente a lo que sucede en los de plantas sanas.

Se comprobó que los tapones tenían naturaleza péctica. Esto se ha verificado por tratamiento con hidroxilamina alcalina y ácido férrico, previa metilación, específico de estas sustancias. En numerosos tapones, mezcladas con sustancias pécticas, hay otras de las cuales no se determinó su constitución química.

Para colorear los tapones del marchitamiento del tomate (*F. oxysporum* f. *lycopersici*) PIERSON *et al.* (1955) utilizaron el tratamiento con el rojo de rutenio. Por el contrario, en las investigaciones realizadas, se ha usado preferentemente hidroxilamina alcalina y ácido férrico, dado que el rojo de rutenio no es específico de sustancias pécticas. En efecto, ese colorante catiónico puede ligarse no solamente a grupos carboxílicos de las moléculas pécticas, sino también a los de algunos otros ácidos.

Al tratar de explicar el mecanismo de acción del hongo, se partió de la hipótesis que *Fusarium oxysporum* f. *pisi* raza 2 produce enzimas pectolíticas las cuales atacarían y descompondrían las pectinas de la laminilla media, la que está constituida por proteínas, sales de Ca y de Mg del ácido péctico y, de acuerdo con recientes estudios de microscopía electrónica, por pectina identificada como un compuesto de hierro del ácido pectin-hidroxámico (WOOD, 1967). Esta hipótesis resulta válida de acuerdo a las siguientes pruebas realizadas con el filtrado del hongo. Se comprobó que el hongo sintetiza "in vitro" enzimas pectolíticas: 1) pectin-metil-esterasas (PME); 2) poligalacturonasas (PG) confirmando así las observaciones de WINSTEAD y WALKER (1954) y 3) *trans*-eliminadoras del ácido poligalacturónico. Al estudiar la acción de este filtrado sobre los vasos xilemáticos, se comprobó que tapones pécticos se originan bajo la acción de estas enzimas, ya que aparece el mismo tipo de tapón tanto en plantas infectadas expe-

rimentalmente con *Fusarium* como en tallos de arveja colocados en el filtrado del hongo; además se verificó que las laminillas medias de células del parénquima xilemático, que rodean los vasos con tapones, aparecen incoloras o poco coloreadas, lo que no se observa en tejidos sanos, en los cuales las laminillas medias se presentan intensamente coloreadas. El proceso patológico descrito es sumamente parecido al que comprobaron PIERSON *et al.* (1955) en el marchitamiento del tomate (*F. oxysporum* f. *lycopersici*). Se supone como PIERSON *et al.* (1955) que las enzimas "que rompen la pectina se difunden a partir de los vasos en el parénquima xilemático que los rodea; allí degradan los materiales pécticos de las laminillas medias produciendo fragmentos pécticos solubles relativamente grandes los que se desplazan en el interior de los vasos, donde gelifican y forman tapones".

CONCLUSIONES

1) La variedad de arveja CUARENTONA, cultivada de preferencia en la Argentina, se comportó como más resistente frente a la inoculación experimental con *Fusarium oxysporum* f. *pisi* raza 2, que la variedad ALASKA 14 A.

2) *Fusarium oxysporum* f. *pisi* raza 2 produce "in vitro" pectin-metil-esterasas (PME), poligalacturonasas (PG) y *trans*-eliminadoras del ácido poligalacturónico, siendo las *trans*-eliminadoras más activas a pH 5.0 que a pH 8.0.

3) En plantas de arveja inoculadas experimentalmente con *F. oxysporum* f. *pisi* raza 2 y en tallos de arveja colocados en el filtrado del hongo, se comprobó el ataque enzimático a sustancias pécticas de las laminillas medias de células del parénquima que rodean los vasos xilemáticos y la formación de tapones de naturaleza péctica.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. A. GRANITI, Universidad de Bari, Italia, por sus sugerencias y críticas, a la Srta. ERIKA BAUER y al Sr. GUALTERIO WINTER por la colaboración prestada en determinaciones espectrofotométricas y cromatográficas.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERSHEIM, P., NEUKOM, H. and DEUEL, H., 1960. Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbauendes. *Helvetica chimica Acta* 43: 1422-1426.
- AYERS, W. A., PAPAVIDAS, G. C. and DIEM, A. F., 1966. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by «*Rhizoctonia solani*». *Phytopathology* 56: 1006-1011.
- BOLLARD, E. G. and MATTHEWS, R. E. F., 1966. The physiology of parasitic disease. *Plant Physiology* 4: 417-550.
- DOLING, D. A., 1964. Glasshouse testing of pea varieties for resistance to «*Fusarium*» wilt. *Plant Pathology* 13: 65-68.
- GEE, M., REEVE, R. M. and MC. CREADY, R. M., 1959. Reaction of hydroxylamine with pectinic acids. Chemical studies and histochemical estimation of the degree of esterification of pectic substances in fruit. *J. agric. Ed. Chem.* 7: 34-38.
- GOZHOSKAR, S. S., SCHEFFER, R. P., WALKER, J. C. et al. 1955. The role of enzymes in the development of «*Fusarium*» wilt of tomato. *Phytopathology* 45: 381-387.
- GRANITI, A., 1962. Osservazioni su «*Spilocaea oleagina*» (Cast.) Hugh. Sulla localizzazione del micelio nelle foglie di olivo. *Phytopathologia Mediterranea* 1: 157-165.
- HOAGLAND, D. R. and SNYDER, W. C., 1933. Nutrition of strawberry plant under controlled conditions: (a) Effects of deficiencies of boron and certain other elements; (b) Susceptibility to injury from sodium salts. *Am. Soc. Hort. Sci. Proc.* 30: 288-294.
- JAUCH, CLOTILDE y CALVO, N., 1964. «*Sclerotium rolfsii*» y algunos otros hongos productores de podredumbre húmeda «soft-rot». VI Reunión Latinoamericana de Fitotecnía 1: 120-122. Lima, Perú.
- JAUCH, CLOTILDE, CALVO, N. y DELLEPIANE, E., 1965. Podredumbres, mohos y viruelas: Trabajos prácticos. Curso de Fitopatología para Graduados. I.N.T.A. 52: 1-33. Buenos Aires.
- LUDWIG, R. A., 1952. Studies on the physiology of hydromycotic wilting in the tomato plant. *Mac Donald Agr. Col. Tech. Bull.* 20, 38 p.
- MC. CREADY, R. M. and REEVE, R. M., 1955. Test for pectin based on reaction hydroxamic acids with ferric ion. *J. agric. Ed. Chem.* 3: 260-262.
- PAPAVIDAS, G. C. and AYERS, W. A., 1966. Polygalacturonate trans-eliminase production by «*Fusarium solani*». *Phytopathology* 56: 1269-1273.
- PIERSON, C. F., GOZHOSKAR, S. S., WALKER, J. C. et al. 1955. Histological studies on the role of pectic enzymes in the development of «*Fusarium*» wilt symptoms in tomato. *Phytopathology* 45: 524-527.
- REEVE, R. M., 1959. Histological and histochemical changes in developing and ripening peaches. II. The cell walls and pectins. *Amer. J. Bot.* 46: 241-248.
- RIKER, A. J. and RIKER, REGINA S., 1936. Introduction to research on plant diseases. Chicago, J. S. Swift Co., 117 p.
- SCHEFFER, R. P. and WALKER, J. C., 1953. The physiology of «*Fusarium*» wilt of tomato. *Phytopathology* 43: 116-125.
- STARR, M. P. and MORAN, F., 1962. Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. *Science* 135: 920-921.
- WINSTEAD, N. N. and WALKER, J. C., 1954. Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. *Phytopathology* 44: 153-158.
- WOOD, R. K. S., 1961. «*Verticillium*» wilt of tomatoes. The role of pectic and cellulolytic enzymes. *Ann. appl. Biol.* 49: 120-139.
- 1967. *Physiology plant pathology*. Oxford, Blackwell, 570 p.

