

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de los factores que intervienen en la evolución de
enfermedades vegetales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

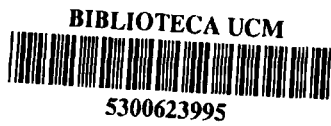
María Teresa Serra Yoldi

Madrid, 2015

D 521.2
SER
est

Iniversidad de Madrid

Facultad de Farmacia



"ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA
EVOLUCION DE ENFERMEDADES VEGETALES"

Tesis de
M^o TERESA SERRA YOLDI



Madrid - 1972

3. - 6.149

Depósito Legal – M-18312-1972
COPIGRAF, S.L. – Ibiza, 52 – MADRID.-9
132

na: X-53-014438-6

La parte experimental de este trabajo ha sido realizada en el Instituto "Jaime Ferran" de Microbiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de la Dra. Genoveva Tejerina, como jefe de la Sección de Microbiología Fitopatológica, a la que agradezco su experta dirección y amables consejos.

Agradezco igualmente el apoyo de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, la generosa ayuda del Instituto "Jaime Ferran", y el soporte económico personal del Ministerio de Educación y Ciencia a través de las becas para la Formación de Personal Investigador.

I N D I C E

Páginas

INTRODUCCION

A. <u>ENFERMEDADES VEGETALES</u>	3
a) Podredumbres.	4
X B. <u>MICROORGANISMOS CAUSANTES DE PODREDUMBRES VEGETALES</u> : criterios para su clasificación.	6
a) Erwinia carotovora; caracteres principales morfológicos, bioquímicos y enzimáticos.	11
C. <u>PLANTAS SUSCEPTIBLES A PODREDUMBRES BACTERIANAS</u>	13
D. <u>ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA PODREDUMBRE VEGETAL</u>	16
a) Protopectinasa.	16
b) Pectinesterasa (PE).	17
c) Poligalacturonasa (PG).	18
d) Acido péctico transeliminasa (PATE).	19
e) Pectintranseliminasa (PTE).	19
X E. <u>COLONIZACION DEL HUESPED</u>	21
a) Penetración.	21
b) Teoría nutritiva.	21

	<u>Páginas</u>
c) Importancia de las sustancias carbonadas del tejido vegetal. . .	25
d) Proteínas y aminoácidos en relación a la resistencia del huésped.	27
e) Papel de los compuestos fenólicos en el establecimiento de la enfermedad.	28
f) Principales factores físicos que intervienen en la colonización del huésped.	30

II. MATERIAL Y METODOS

A. <u>PRUEBAS EN EL PATOGENO.</u>	35
a) Erwinia carotovora.	35
b) Medios de cultivo.	36
c) Condiciones de incubación.	37
d) Determinación de enzimas.	38
1: Poligalacturonasa(PG).	39
2: Pectinesterasa (PE).	40
3: Acido péctico transeliminasa (PATE).	41
4: Pectintranseliminasa (PTE).	44

	<u>Páginas</u>
B. <u>PRUEBAS EN EL POSIBLE HUESPED.</u>	45
a) Plantas objeto de estudio:	
Brassica oleracea, Phaseolus	
vulgaris y Vicia faba.	45
b) Cultivo de las plantas.	46
c) Técnicas de inoculación.	47
d) Preparación de cortes histológicos.	47
e) Determinación de compuestos químicos	48
1: Proteína, extracción y	
valoración.	48
2: Aminoácidos libres, extrac-	
ción e identificación.	50
3: Sustancias reductoras, extrac-	
ción y determinación.	54
4: Azúcares libres, extracción	
y determinación cualitativa.	55
5: Sustancias pécticas, extrac-	
ción y determinación.	57
6: Derivados fenólicos, extrac-	
ción y determinación.	59
7: Determinación de humedad.	61
8: Determinación de pH.	61

	<u>Páginas</u>
f) Determinación de enzimas vegetales.	62
1: Métodos de extracción.	62
2: Valoración de PG.	63
3: Valoración de PE.	63
4: Valoración de PATE y PTE.	64
5: Valoración de fenolasas.	65

III. RESULTADOS

A. <u>PRUEBAS EN EL PATOGENO.</u>	69
a) Condiciones de cultivo de E. carotovora.	69
b) Enzimas sintetizados.	71
1: Poligalacturonasa (PG), producción y actividad.	71
2: Pectinesterasa (PE), producción y actividad.	77
3: Acido péctico transeliminasa (PATE), producción y actividad en los medios S y CG.	79
4: Pectintranseliminasa (PTE), producción y actividad en los medios S y CG.	90

	<u>Páginas</u>
B. PRUEBAS EN LAS PLANTAS SANAS Y ENFERMAS.	100
a) Selección de posibles huéspedes. .	100
1: Respuesta de Brassica oleracea ante el ataque de E. carotovora	100
2: Comportamiento de Phaseolus vul- garis frente a la infección pro- ducida por E. carotovora. . . .	102
3: Sintomatología de plantas de Vi- cia faba invadidas por E. caro- tovora.	103
b) Determinación de compuestos químicos	106
1: Contenido en Nitrógeno.	106
2: Cantidad de proteína presente.	108
3: Aminoácidos libres existentes en Brassica oleracea.	110
4: Aminoácidos detectados en plan- tas sanas y enfermas de Vicia faba.	112
5: Aminoácidos que aparecen en plantas sanas y enfermas de Phaseolus vulgaris.	114
6: Contenido en sustancias reductoras.	117

	<u>Páginas</u>
7: Azúcares presentes en plantas sanas y enfermas de Vicia faba.	119
8: Azúcares libres existentes en plantas de Phaseolus vulgaris sanas y enfermas.	120
9: Azúcares detectados en plantas de Brassica oleracea. . . .	120
10: Contenido en sustancias pécticas	121
11: Compuestos fenólicos.	123
12: Grado de humedad.	125
13: Valores de pH.	127
c) Determinación de enzimas vegetales.	129
1: Presencia de PG en plantas sanas y enfermas.	129
2: Presencia de PE.	131
3: Presencia de PATE.	131
4: Presencia de PTE.	134
5: Presencia de fenolasas. . . .	134

	<u>Páginas</u>
IV. <u>DISCUSION</u>	139
V. <u>CONCLUSIONES</u>	177
VI. <u>RESUMEN</u>	185
VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	195

I. INTRODUCCION



A.

ENFERMEDADES VEGETALES

Toda planta que evoluciona en los múltiples lugares de la tierra es huésped potencial de numerosos microorganismos capaces de atentar contra su desarrollo normal y ocasionar su total destrucción. Incluso en países como América donde se dispone de medios abundantes de protección vegetal, las pérdidas económicas que supone la destrucción de cosechas por enfermedad llega a alcanzar cifras elevadísimas, y si a ello se añade, como consecuencia directa, la disminución en disponibilidades alimenticias, se comprenderá el interés extraordinario con que los fitopatólogos de todo el mundo intentan conocer el proceso de infección vegetal y la posibilidad de su control.

Las enfermedades que padecen los vegetales si bien fueron atribuidas a microorganismos tan solo dos años después de la consideración microbiana de la enfer-

medad animal, no por ello han dejado de llamar poderosamente la atención, por ser una de las causas que decide la economía de un país y en no pocas ocasiones su política comercial con el exterior.

En un principio fueron los propios cultivadores del campo, quienes vinieron a dar nombre a todas aquellas enfermedades que veían aparecer en sus tierras de cultivo, prestando atención para ello a los síntomas más característicos que revelaban la aparición de la enfermedad. Este criterio ha dominado bastante tiempo, y son varias las clasificaciones que en él se basan, basta recordar la establecida por WALKER en 1950 (129), que distingue entre enfermedades que ocasionan manchas en las hojas, reblandecimiento de los tejidos, marchitez, disminución de crecimiento y desarrollo anormal con producción de tumores.

a) Podredumbres

Con una u otra denominación aparece en todas las clasificaciones la enfermedad que cursa con pérdida de consistencia del tejido parenquimatoso vegetal, se-

guida de ablandamiento y podredumbre mas o menos viscosa que al generalizarse causa la destrucción completa de la planta. Esta enfermedad es especialmente temida por extenderse no solo sobre plantaciones en desarrollo sino también sobre frutos y productos alimenticios en almacenaje y transporte.]

En España la vemos citada por RUIZ DE GORDOA en 1959 (95), quien la describe y señala que "produce efectos desastrosos". En 1961, DOMINGUEZ GARCIA-TEJERO (25) la incluyó en su revisión y llamó a su agente productor Bacillus phytophthorus.

[También es sobradamente conocida en el resto de Europa, así como en Africa, Asia, Australia y América. En realidad puede decirse que aparece en todos los lugares en los cuales las condiciones climáticas son favorables al desarrollo del parásito.]

[Vamos pues, en el presente estudio, a considerar este tipo de enfermedad a los dos niveles fundamentales y decisivos que son el agente causante de la mis-

ma por una parte, y los vegetales que sufren su acción destructora, por otra.] Además, teniendo en cuenta que la relación huésped-parásito puede ser decidida por muy variados factores, creemos también oportuno considerar algunas circunstancias que concurren en el momento en que el microorganismo entra en contacto con el tejido vegetal.]

B) MICROORGANISMOS CAUSANTES DE PODREDUMBRES VEGETALES

[Los primeros microorganismos a los que se atribuyó la podredumbre en las plantas fueron hongos, cosa nada extraña ya que hongos fueron los primeros agentes microbianos considerados fitopatógenos y fue necesario que los experimentos de BURRILL en Illinois (14) y WAKKER en Holanda (127) vinieran a demostrar que también las bacterias tenían propiedades patógenas sobre vegetales.]

[La enfermedad que nos ocupa fue estudiada por JONES (58) en los alrededores de 1900 en Vermont, denominando al agente patógeno productor de la misma Bacillus

carotovorus.] Simultáneamente a estos trabajos, APPEL (4), en Alemania obtuvo un cultivo puro de una bacteria causante del "reblandecimiento de la patata". En Holanda van HALL (43) encontró el Bacillus atrosepticus y HARRISON (48) en Canadá, el Bacillus solanisaprus como agentes productores de esta misma enfermedad.

Con el fin de reflejar el confucionismo reinante en la nomenclatura y clasificación del agente bacteriano causante de ablandamientos vegetales, vamos a hacer un breve bosquejo histórico de los diferentes criterios que han dominado en distintas épocas.

La inclusión de los géneros *Erwinia* y *Phytomonas* en una tribu única (33) se basaba en numerosos caracteres comunes, entre los que figuraba su fitopato-geneidad. No obstante esta idea apenas se sostuvo y ya en 1948 el *Bergey's Manual* (11) incluye a las *Erwinias* dentro de la familia Enterobacteriáceas con la que presenta una gran identidad pese a su carácter fitopatógeno. JACOBS, GERSTEIN y WALTER (54) siguen este mismo acuerdo en su *Diccionario de Microbiología*. Por el con-

trario PREVOT (86) estima que el género Erwinia debe incluirse, no dentro de las Enterobacteriáceas, sino de las Pseudomonadáceas, idea que es compartida con BRISOU (13) si bien admite que esta última familia resulta demasiado compleja.

Esta misma complejidad se manifiesta, también, dentro del propio género Erwinia y explica los intentos de WALDEE (128) de separar las especies E. amylovora y E. carotovora en distintas familias, proponiendo dar a esta última el nombre de Pectobacterium carotovorum. En favor de esta sugerencia se muestran HAMON y PERON (44) que estudian el poder antagónico de los cultivos de Erwinia que inhiben por una parte el crecimiento de la familia Enterobacteriáceas, y de otra de la familia Pseudomonadáceas, lo que les lleva a sugerir que la especie E. amylovora debe incluirse en una familia llamada Erwinícea y el resto de las especies, que permanecerían dentro de las Enterobacteriáceas, se incluirían en el género Pectobacterium. Este criterio sobre la posición taxonómica del género Erwinia es precisado aun mas por los mismos autores, mediante estudios sobre su

sensibilidad a diversos fagos y concluyen confirmando la teoría de KAUFFMANN (60) de incluir al género Erwinia dentro de la familia Enterobacteriáceas.

A pesar de todas estas consideraciones, los criterios siguen en discusión, e intentan fundamentarse en nuevos caracteres como es la capacidad de digerir pectinas. FROBISHER (33), había atribuido esta característica a Acrobacter aerógenes y Escherichia coli, en tanto que DAVIS y EWING (18) consideran que el único género de la tribu Klebsiellae capaz de licuar pectato es el Pectobacterium, lo que viene a confirmar ZINSSER (136) cuando señala que solo las Erwinias pueden licuar pectato sódico, mientras que las Enterobacteriáceas no lo hacen.

MARTINEC y KOCUR (76) deciden que la diferencia entre las especies del género Erwinia justifica agrupar todas ellas en dos tipos, que son los correspondientes a E. amylovora y E. carotovora. Posteriormente LOCKHART y KOENING (73) recurren a la taxonomía numérica considerando caracteres secundarios, para concluir que el grupo formado por E. carotovora, aroideae, atrosép-

tica y ananas pueden constituir una especie sencilla separada de E. amylovora y perteneciente a la familia Enterobacteriáceas.

Ultimamente el estudio de la composición de las bases del DNA aporta una información importante para el esclarecimiento del problema taxonómico, sobre todo cuando este estudio va unido a un análisis de los cultivos bacterianos por otros medios bioquímicos.

Varios trabajos realizados sobre este punto han demostrado que las bacterias que tienen diferente composición de las bases DNA caen en diferentes grupos cuando sus caracteres fenotípicos son clasificados por métodos numéricos, (74). De LEY en 1970 (72) indica que el % GC (% de moles de guanina + citosina respecto a los moles de bases totales del DNA) es una de las pocas constantes en Biología de gran importancia para la clasificación e identificación de microorganismos.

Hoy se conocen los valores del % GC de varios géneros de bacterias Gram negativas con flagelos peritricos, y aunque Erwinia amylovora y Erwinia carotovora

son tan diferentes como por ejemplo Enterobacter cloacae y Shigella dysenteriae (109), los valores de % GC correspondientes a estas dos especies de Erwinia están en el orden de 50-56 (71) y solamente los géneros de las Enterobacteriáceas cuyo % GC se conoce, como Escherichia, Shigella y Klebsiella, son los que se encuentran en esta línea, e incluso los datos de % GC no justifican que se forme un género separado de Erwinia amylovora y Erwinia carotovora.

- a) Actualmente el criterio reinante, que es el seguido por nosotros, considera a la bacteria E. carotovora (del género Pectobacterium de Waldee) perteneciente a la familia Enterobacteriáceas y perfectamente diferenciada de E. amylovora, con un % GC = 52'1 (109). Sus principales características son las que señalamos a continuación.

Morfología: Es un bacilo de 0'7 x 2'0 u aunque a veces puede alcanzar 5'0 u de longitud, su tinción al Gram es negativa y su movimiento se debe a flagelos peritricos. Suele aparecer aislada o formando cadenas muy cortas.

Su temperatura óptima de cultivo es de 25°C, con una máxima de 38°C y mínimo de unos 4°C.

Sobre placas de agar común forma colonias redondas, convexas, de bordes enteros y color blanco sucio. En medios líquidos forma velo muy ligero y escaso sedimento.

Caracteres bioquímicos: Los mas importantes para su identificación son los siguientes: no produce sulfhídrico, reduce los nitratos a nitritos, licua la gelatina, produce coagulación ácida en la leche, no produce indol, tampoco amonio a partir de urea (da negativa la prueba de Voges-Proskauer) asimila citratos como única fuente de carbono, crece abundantemente en medio con albúmina y produce ácido y gas cuando cultiva en presencia de los siguientes azúcares: arabinosa, sacarosa, xilosa, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, lactosa, maltosa, trealosa, melibiosa, celobiosa, rafinosa, adonita, manita, sorbita, dulcita, inosita, dextrina y salicina.

Caracteres enzimáticos: Es una de las primeras bacterias relacionadas con las podredumbres vegetales y en la que se ha estudiado el equipo enzimático relacionado con este proceso infectivo. Los enzimas pectolíticos que sintetiza son de naturaleza adaptativa y pertenecen a los tres grandes grupos conocidos: pectinesterasa, poligalacturonasa y transeliminasa.

C. PLANTAS SUSCEPTIBLES A PODREDUMBRES BACTERIANAS

Conviene recordar que solamente dos años después de que KOCH (65) demostrara la enfermedad bacteriana en los animales, se comprobó el origen también bacteriano de la enfermedad vegetal. Pero no obstante este reconocimiento, hubo en los primeros años un cierto recelo en admitirlo plenamente, manifestándose dos criterios opuestos entre sí, que fueron mantenidos por SMITH (101), quien sostenía haber visto las bacterias en la planta y por FISCHER (30) quien negaba esta realidad. Esta controversia, hoy día de interés únicamente histórico, fue dejando paso a múltiples confirmaciones que colaboraron, a lo largo de los años, al estableci-

miento de la Fitopatología moderna, ciencia que surgió ayudada por cuantas técnicas nuevas hicieron posible la interpretación de no pocos problemas relacionados con los microorganismos fitopatógenos.

Puede admitirse que no existe planta ni producto vegetal, que en determinadas condiciones, no llegue a perecer víctima de enfermedad ocasionada por microorganismos, si bien hay que hacer notar que desde el primer momento pudo observarse la predisposición, mas o menos marcada, de determinados vegetales a dejarse dominar por grupos concretos de bacterias.

En el caso que nos ocupa, de enfermedades vegetales que cursan con reblandecimiento de sus tejidos, hemos de señalar que no existe estricto parentesco botánico entre los posibles huéspedes para la bacteria E. carotovora. De acuerdo con STAPP (110) presentamos en el cuadro siguiente la clasificación botánica de aquellas especies vegetales en las que se ha observado esta enfermedad.

Cuadro n° 1

Especie vegetales en las que se puede alojar la bacteria Erwinia carotovora, y causar su destrucción por ablandamiento de sus tejidos.

ORDEN	FAMILIA	SUBFAMILIA	TRIBU	GENERO
Tubiflorae	Solanaceae		Solaneae	Lycopersicum Solanum Capsicum Hyosciamus
			Cestreae Datoreae	Nicotiana Datura
	Boraginaceae	Boraginoideae	Anchuseae	Symphytum
Liliflorae	Liliaceae	Allioideae Asperagoideae Lilioideae	Irideae	Iris
				Allium
				Asparagus
				Lilium Iacintus
Umbelliflorae	Umbelliferae		Ammineae Daucineae	Apium Daucum
Rhoedaleae	Cruciferae	Silicoideae	Brasiceae	Brassica
Synandrae	Compositae	Ligulifloroideae Tubulifloroideae Radiadoideae		Lactuca Cichorium
				Cinara
				Dahlia
Cucurbitales	Cucurbitaceae			Cucumis Cucurbitis
Rosales	Papilionaceae	Papilionoideae	Trifolioleae Vicieae	Phaseolus Vicia
Centrospermae	Chenopodiaceae	Cycloloboideae	Atripliceae	Spinacia
Gruinales	Geraniaceae			Pelargonium

53000-99

D. ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA PODREDUMBRE VEGETAL

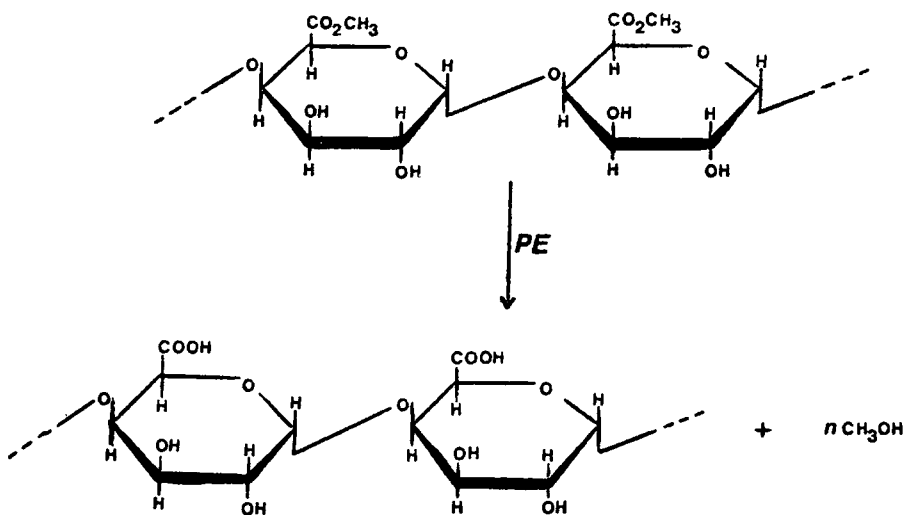
Antes de seguir adelante creemos necesario referirnos a los enzimas pectolíticos, por ser los agentes que intervienen muy activamente (no ya en cuanto son de origen bacteriano, sino también de origen vegetal) en el desarrollo normal o anormal de plantas y en la conservación de ellas y de sus productos.

La confusión que durante mucho tiempo ha existido sobre la clasificación de las sustancias de naturaleza péctica se refleja en la diversidad de nombres que han recibido los enzimas que sobre ellas actúan.

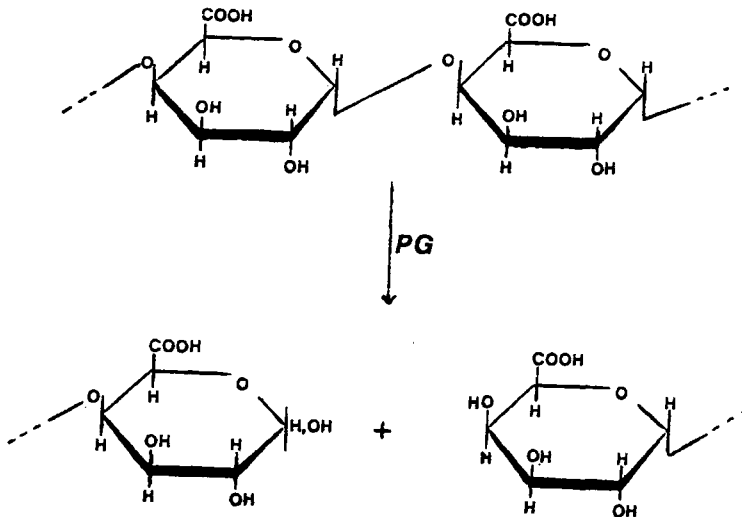
Esto hizo que en 1944 la Sociedad Americana de Química nombrara una Comisión para aclarar esta nomenclatura y decidir el nombre que debe usarse para cada uno de los enzimas pectolíticos. Así se establecieron los siguientes nombres:

- a) Protopectinasa: enzima que actúa sobre protopectina transformándola en un producto soluble. Anteriormente se designó con los nombres de pectosinasa y propectinasa.

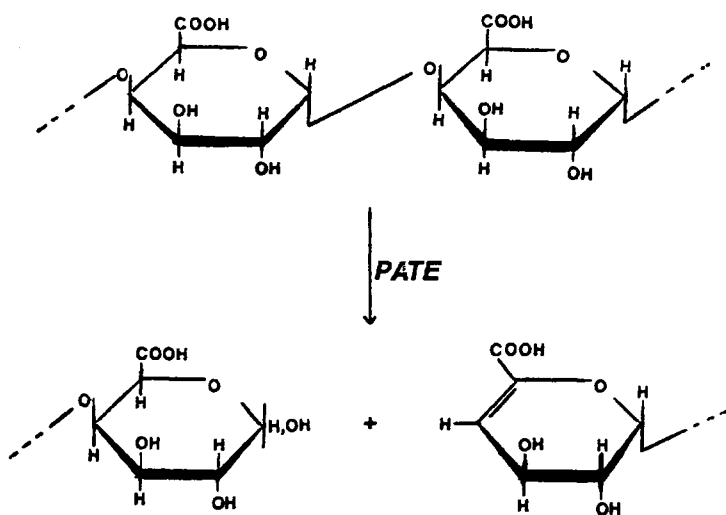
b) Pectinesterasa (PE), enzima que cataliza la hidrólisis de las uniones ester de sustancias pécticas, produciendo metanol y ácidos pécticos. Antes había sido conocida como pectasa, pectindemetoxilasa, pectinmetoxilasa, pectolipasa, pectinmetilesterasa y pectinesterasa.

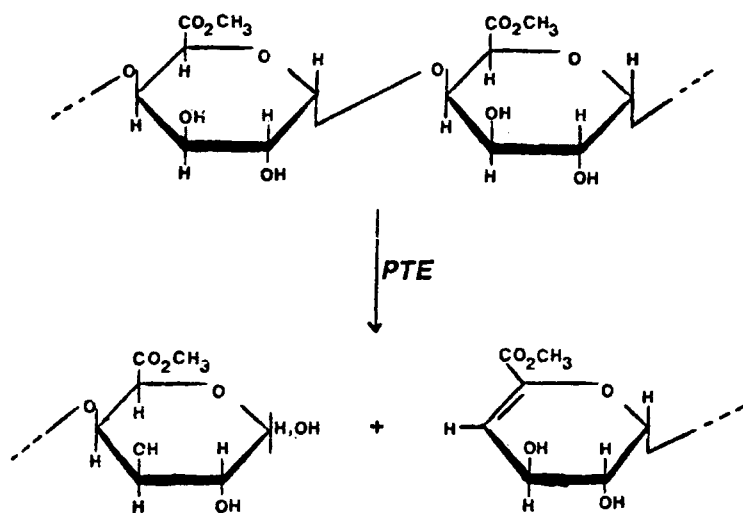


c) Poligalacturonasa (PG), enzima que cataliza la hidrólisis de uniones glucosídicas 1-4 de galacturónidos deesterificados, produciendo urónidos de bajo peso molecular e incluso el ácido monogalacturónico.



d) y e) Enzimas de tipo transeeliminativo: ácido péctico
co transeeliminasa (PATE) y pectintranseeliminasa (PTE),
descritos por ALBERSHEIM, NEUKOM y DEUEL (1), estos en-
zimas rompen la molécula péctica en el átomo de carbono 4
y al mismo tiempo elimina hidrógeno del carbono 5.





De acuerdo con la nomenclatura de DEMAIN y PHAFF (23) todas las designaciones anteriores se amplían al considerar si la hidrólisis procede en la parte extrema o media de la molécula péctica, lo que se expresa mediante los prefijos exo y endo respectivamente.

E. COLONIZACION DEL HUESPED

- a) En cuanto a la forma en que la bacteria fitopat6gena consigue abrirse camino a trav6s del tejido vegetal con el que establece contacto, hay que hacer constar que en general, nunca consigue penetrar una superficie intacta sino aquellas que han sido previamente lesionadas por acci6n de los mas diversos agentes.

Se conocen bacterias fitopat6genas que penetran por aberturas naturales como estomas, nectarios, hidatodos, etc., pero en el caso de Erwinia carotovora, exige para provocar su infecci6n la presencia de alguna herida que rompa la continuidad de la cut6cula vegetal. Estas heridas a veces son naturales al producirse en el desarrollo habitual de la planta y en otras ocasiones son causadas por el viento, granizo, insectos, nem6todos, hongos, etc.

- b) En cualquier caso, y una vez la bacteria alojada en el tejido vegetal, la continuidad del proceso depende de factores como la temperatura, humedad, pH,

luz y en definitiva de la composición química del propio vegetal atacado, que es de donde el patógeno ha de tomar sus requerimientos nutritivos. A este respecto podemos señalar los trabajos de GRAHAM y col. (40) que indican cómo E. carotovora precisa, para su difusión de temperaturas mas altas que E. atroseptica, que puede desarrollarse perfectamente a 18°C. WINFREE y col. (133) por su parte, comprueban que los casos de enfermedad por E. carotovora aumentan en razón directa al contenido en agua del tejido y del terreno. También FRIEDMAN y CEPONIS (32) relacionan la acidez del tejido del huesped con el desarrollo de E. carotovora, señalando a su vez la dependencia entre el pH y la actividad de sus enzimas pectolíticos.

Respecto a la importancia de los factores químicos, RUBIN y ARTSIKHOVSKAYA (93) se expresan en su libro "Bioquímica y Fisiología de la inmunidad de las plantas" en los siguientes términos: "La susceptibilidad a la enfermedad depende de si el tejido de la planta es rico en sustancias esenciales para la nutrición del microorganismo parásito. La resistencia, por otra parte viene determinada por una deficiencia en la plan-

ta de tales sustancias, o por la presencia en las células del huésped de compuestos tóxicos para el patógeno".

Esta teoría nutritiva había sido desarrollada anteriormente por GARBNER (34).

Si tras penetrar en la planta o tejido vegetal la bacteria E. carotovora, encuentra las circunstancias propias a su desarrollo y síntesis enzimática, aparecen rápidamente las lesiones características, que se inician en la lámina media de la pared celular que envuelve a la célula vegetal. Esta pared va siendo desintegrada al perder su constitución las sustancias pécticas que la forman y en consecuencia desaparece la rigidez que dichas sustancias condicionan, a la vez la bacteria consigue penetrar dentro de la célula vegetal y utilizar los componentes que ésta le ofrece. De esta forma E. carotovora se multiplica y atacando a células próximas hace que la lesión blanda se extienda en un área cada vez más extensa hasta dominar y destruir totalmente al producto atacado.

Ahora bien, el espectro bacteriano de la enfermedad vegetal varía, de forma muy marcada, de unas plantas a otras. Se conocen microorganismos de un poder infeccioso elevadísimo, de igual forma que hay plantas con una especial susceptibilidad para albergar a diferentes patógenos. Pero frente a estos casos extremos aparecen vegetales que son muy difícilmente dominados por una infección y pese a ser atacados insistentemente por muy diversos patógenos, no llegan a presentar ningún tipo de lesión.

Los factores que deciden la aparición o negación de la enfermedad vegetal proceden tanto del posible huésped como del microorganismo atacante. En el caso concreto que nos ocupa, se sabe positivamente que la bacteria E. carotovora es responsable de podredumbres en tejidos vegetales de muy diferente origen, a la vez que existen algunas plantas que se muestran totalmente resistentes a su ataque. El por qué de esta resistencia en tales casos puede estar vinculado a factores de muy diverso tipo. Así se ha hablado de inmunidad, de características morfológicas, de efecto quimotáctico de exudados, de sustancias tóxicas producidas por el vegetal, de carencias nutritivas impuestas por la composición química del tejido, etc., etc.

Nosotros hemos concedido gran importancia a la teoría de nutrición defendida por GARBER (34) y LEWIS (70) entre otros, e intentamos por ello exponer a continuación algunos trabajos referentes a la influencia de diversos compuestos químicos del tejido vegetal sobre la capacidad patogénica del posible parásito.

Es evidente la existencia de una relación de tipo nutritivo entre el patógeno y su huésped, ya que el desarrollo del primero depende de la utilización del material que obtiene del segundo. Por tanto se justifica la dedicación que a este problema han concedido investigadores de diversos países.

- c) La necesidad de una fuente carbonada para la nutrición de los microorganismos condujo a algunos autores a considerar el alto contenido en azúcares del tejido vegetal como un hecho favorable a la infección (5, 82). No obstante esta afirmación, otro grupo de especialistas vinieron a señalar que la disminución en azúcares de la planta, aumenta las condiciones favorables para el desarrollo en ella de microorganismos (113, 125). Y por su

parte ROEMER (90), tras revisar los estudios realizados sobre este tema, concluía que no existe relación alguna entre el contenido en azúcares del tejido y la resistencia o susceptibilidad del mismo a la infección.

Ante estas conclusiones tan opuestas pareció lógico pensar que no era lo decisivo la cantidad de azúcares del tejido, sino el tipo predominante de ellos, en el órgano atacado por el patógeno. Así RUBIN y col. (93) demuestran que la relación entre sacarosa y manosa determina el grado de resistencia de la planta al microorganismo patógeno.

Pero la influencia de los azúcares no se manifiesta solamente en el desarrollo de la bacteria, sino también en su capacidad de síntesis enzimática, puesto que se conocen casos en que se producen acciones represoras que impiden la acción de enzimas imprescindibles para el avance de la infección. En este sentido se manifiestan, entre otros, GAUMANN y BOHNI (39), KEEN y HORTON (61), TEJERINA y SERRA (118), etc.

d) Algo semejante a lo que acabamos de exponer sobre azúcares, ocurre cuando se considera el grupo de proteínas y aminoácidos. GRUMMER (42) indica que si el contenido en proteínas del tejido disminuye por cualquier razón, se produce una disminución en la resistencia del mismo a la enfermedad.

Los datos aportados por RUBIN y ARTSIKHOVSKAYA (93) sobre la cantidad de proteínas y de aminoácidos de dos variedades de col, una resistente y otra susceptible a Botrytis cinerea, parecen confirmar el hecho de que la resistencia de la planta está íntimamente relacionada con su composición protéica, observando estos autores que la variedad resistente tenía mayor cantidad de proteína y en cambio la susceptible era mas rica en aminoácidos.

La composición cualitativa de aminoácidos del tejido tiene gran importancia en la respuesta de la planta a la invasión por el patógeno. Así los trabajos de ALTEN y ORTH (2) muestran que algunos aminoácidos estimulan el desarrollo de Phytophthora infestans, mien-

tras que otros lo inhiben. ELGERSMA (27) nos expone en su trabajo que en la savia de olmos resistentes a la enfermedad producida por Ceratocystis ulmi existe gran cantidad de prolina, mientras que en la de los susceptibles no se detecta este aminoácido. Sin embargo no está completamente clara la relación que puede tener la resistencia a la enfermedad y la presencia de estos aminoácidos.

GARBER y SCHAEFFER (35) aislaron tres mutantes de Erwinia aroideae que no son capaces de sintetizar histidina y comprobaron que en plantas en las cuales no existía la cantidad de histidina suficiente para el desarrollo de la bacteria, ésta no producía la enfermedad.

- e) También las sustancias fenólicas que contiene el tejido vegetal tienen un papel interesante en favorecer o impedir la difusión de la enfermedad ocasionada por bacterias, puesto que pueden ejercer un papel inhibitorio de su crecimiento y así mismo de la síntesis de sus enzimas pectolíticas.

WALKER y STAHMANN (130) señalaron que las variedades de cebollas con brácteas coloreadas eran resistentes a la infección producida por Colletotrichum circinans, que por el contrario invadía rápidamente a aquellas cebollas que eran incoloras. En estudios posteriores obtuvieron un extracto de las cebollas coloreadas y comprobaron en él la presencia de ácido protocatéquico y otros derivados fenólicos, que se relacionaron con el proceso de resistencia.

También KARGAPOLOVA (59) estudia la toxicidad de las sustancias fenólicas y establece distintos grados con respecto a su estructura química, aportando datos que fueron igualmente confirmados por GREATHOUSE y RIGLER (41) y por RICH y HORSPALL (89).

Por su parte los microorganismos fitopatógenos pueden responder de muy distinta forma a la presencia de compuestos fenólicos y frente a algunos que son extraordinariamente sensibles, otros se muestran totalmente indiferentes a una misma sustancia. Basta recordar con TOMIYAMA (122) que el ácido clorogénico es muy

tóxico para Streptomyces scabies y no lo es nada para Ceratostomella fimbriata.

En el papel que estos compuestos juegan en la defensa de las plantas tiene gran importancia la presencia en las mismas del enzima llamado polifenolasa, que actuando sobre los fenoles existentes en el tejido, produce quinonas cuya toxicidad es mucho mayor que la de los productos originarios.

- f) Otro factor de gran interés en el proceso infectivo es el pH del tejido de la planta ya que todos los microorganismos evolucionan dentro de determinados límites de acidez. Por ello SAVULESCU (97) considera que la acidez del jugo celular puede ser en algunos casos un factor decisivo en la resistencia de la planta a la enfermedad. Un hecho concreto lo tenemos en el caso estudiado por GARDNER y KENDRICK (37), aquí, el agente productor de la enfermedad, Xanthomonas vesicatoria, es incapaz de desarrollarse a pH inferior a 5, de acuerdo con esto el fruto de tomate maduro cuyo pH oscila entre 4'0 y 4'6 es completamente resistente a la enferme-

dad "mancha bacteriana", en cambio la planta y el fruto verde cuyo pH es mayor que 5 son fácilmente atacadas. Otro ejemplo es el caso del llamado "fuego bacteriano" del tabaco: el metabolismo del microorganismo patógeno Pseudomonas tabaci, hace que el pH de los espacios intercelulares de la planta cambie de tal modo que llega un momento en que la bacteria no puede multiplicarse. GARBBER (36) comprueba que la capacidad tampón del extracto de hoja de tabaco susceptible es mucho mayor que la de las hojas de tabaco resistente.

También el pH puede actuar de una manera indirecta sobre el patógeno, pues puede aumentar el efecto de ciertas sustancias tóxicas. WALKER y col. (102) descubrieron la correlación existente entre pH y toxicidad de extractos de la familia crucíferas para Colletotrichum circinans, observando que la máxima toxicidad de hidroquinona se encuentra a pH 4'0 y la del catecol a pH 5'0.

También depende del pH existente en el tejido la actividad o inactividad de los enzimas producidos por el patógeno (64).

Otro de los factores físico-químicos de mas importancia en el proceso de defensa de la planta es el contenido en agua del tejido vegetal, este hecho fue demostrado por RUBIN (93) mostrando que raices marchitas de remolacha azucarera, que han perdido su turgencia, son mucho menos resistentes a la infección con Botrytis cinerea.

Otros autores como WOODMAN y BARNELL (135) han comprobado la relación que existe entre la pérdida de agua por el tejido y el aumento de receptibilidad del mismo al ataque del microorganismo patógeno.

II. MATERIAL Y METODOS



A. PRUEBAS EN EL PATOGENO

a) Microorganismo

En todas nuestras experiencias hemos empleado la bacteria Erwinia carotovora procedente de la Colección Nacional de Bacterias Fitopatógenas de Harpenden (Inglaterra), que conservamos a 4° C. en agar inclinado y se resiembramos semanalmente. En todos los ensayos se usan cultivos jóvenes de 16 ó 24 horas, que se suspenden en agua destilada esteril hasta alcanzar la concentración conveniente a cada experiencia.

El control de la pureza del cultivo se mantiene por observación al microscopio óptico y por morfología de sus colonias sobre placas de agar glucosado.

b) Medios de cultivo

Según el tipo de ensayo que se plantea se emplean diferentes medios de cultivo que tienen como componente común pectina procedente de manzana, ya que la experiencia confirma que en los medios en que no existe sustrato inductor, no aparecen enzimas pectolíticas, y la presencia de dichos enzimas es uno de los estudios realizados a lo largo de nuestro trabajo.

En general son dos los medios de cultivo que se usan. Uno de ellos ha sido señalado por SMITH (104), lo designamos como medio S y responde a la fórmula siguiente:

Pectina	-----	0'2 %
Glucosa	-----	0'02%
L-asparragina	-----	0'04 %
Triptona	-----	0'2 %
Ext ^o de levadura	-----	0'1 %
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	-----	0'1 %
Na_2HPO_4	-----	0'002 %
K_2HPO_4	-----	0'002 %

El otro es un medio mínimo compuesto en nuestro laboratorio (117) al que nos referimos como medio CG y contiene los siguientes componentes:

Pectina	-----	0'2 %
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-----	0'1 %
Na ₂ HPO ₄	-----	0'002 %
K ₂ HPO ₄	-----	0'002 %

A esta solución se le añade en el momento de usarla 1 mg. de L-cistina y 1 mg. de L-glutámico por ml. de medio. Su pH es de 6'8-7'0.

- c) El cultivo de la bacteria se lleva a cabo en matraces Erlenmeyer, de la capacidad necesaria, que se mantienen en agitación a 25° C. durante los tiempos que requieren cada una de las experiencias planteadas. Cuando se precisa seguir el crecimiento de Erwinia carotovora se emplean matraces provistos de un tubo de fotómetro a fin de facilitar las lecturas de turbidez en un Spectronic 20 (Bausch and Lomb) a 600 mu.

Para inocular cualquiera de los medios se utiliza una suspensión acuosa de Erwinia carotovora, preparada a partir de un cultivo en agar glucosado o agar extracto de judía de 16 a 24 horas. Las suspensiones, con turbidez correspondiente a 0'4 D.O., se emplean en la proporción de 1 % (v/v) respecto al medio de cultivo a inocular.

d) Determinación de enzimas

Los enzimas de carácter pectolítico que Erwinia carotovora es capaz de sintetizar corresponden al grupo de exoenzimas, por lo que su determinación se practica en el mismo medio de cultivo después de eliminar de él la bacteria por filtración o centrifugación.

Los enzimas que estudiamos y las técnicas seguidas para su valoración son las siguientes.

1: Poligalacturonasa (PG)

Las muestras a determinar están representadas por los sobrenadantes de los correspondientes cultivos, que se emplean en distintas cantidades, para conocer cual es la mas conveniente. Como sustrato usamos pectato sódico disuelto en tampón Tris-ClH a pH 9'3. Su concentración varía desde 0'1 a 1'2 % a fin de observar la mas adecuada para lograr una actividad óptima.

En total la mezcla de incubación alcanza un volumen de 20 ml., en el que se incluye FNa en la concentración final de 0'2 %.

El método que hemos seguido es el de JANSEN y Mc. DONNELL (55) que mantiene la mezcla de incubación a 30-32° C. en B.M. y valora por iodometría los grupos reductores que aparecen después de actuar el enzima PG. Como controles se emplean las mismas muestras de sobrenadante después de ser inactivadas por calentamiento.



El tiempo de incubación de la mezcla es de 5 horas, transcurridas las cuales se toman 3 ml. que se llevan sobre CO_3Na_2 1M., para detener así la actividad del enzima y hacer su valoración.

Los resultados se expresan en mg. de ácido monogalacturónico liberados por ml. de sobrenadante, en las condiciones en que se efectua la experiencia.

2: Pectinestcrasa_(PE)

Este enzima actua sobre la molécula de pectina rompiendo las uniones ésteres y dejando en libertad grupos carboxílicos, que son los que se valoran por alcalimetría, empleando una solución de NaOH 0'02 N para lograr una mayor precisión. La mezcla de incubación alcanza un volumen de 21 ml. y la constituyen, como sustrato, pectina procedente de manzana que incorporamos a concentraciones distintas para determinar su concentración óptima; los límites en que se opera abarcan de 0'1 a 1'2 % en peso por volumen. El enzima que se investiga se aporta en forma de sobrenadante de un cultivo de Erwinia carotovora obtenido en el medio y las

condiciones que se fijan previamente; su volumen también se establece después de comprobar la mas conveniente relación enzima/sustrato. El sistema contiene, así mismo, ClNa a una concentración final de 0'4 M, y su pH inicial es de 7'0. La temperatura de incubación es de 35° C. y el tiempo se prolonga durante 1 hora, valorando el aumento de acidez con NaOH, según establecen WAGGONER y DIMOND (126).

Los resultados se expresan en miliequivalentes de grupos metoxi liberados por ml. de sobrenadante durante 1 minuto, y para su cálculo se tiene en cuenta el correspondiente control preparado con los mismos elementos después de inactivar el sobrenadante que proporciona el enzima

3: Acido péctico transeliminasa (PATE)

La característica mas notable en la acción de este enzima se manifiesta en la aparición de un doble enlace en posición 4-5 de la molécula del ácido urónico, lo que le confiere la propiedad de presentar una

manifiesta absorción con un máximo a 230 m μ . Y en esta propiedad es precisamente en la que se basa la determinación del enzima.

La mezcla de incubación se prepara en tampón glicina-NaOH pH 8'6 y alcanza un volumen final de 10 ml. Ensayamos en ella la concentración mas conveniente de pectato sódico, que hacemos oscilar entre 0'1 y 0'8 % de peso por volumen. También se prueban distintas cantidades de sobrenadante que van desde 0'1 a 0'6 ml. en el volumen total de la mezcla. Y como componente básico figura Cl_2Ca que alcanza una molaridad de 2×10^{-3} .

El tiempo de incubación de esta mezcla es de 1 hora a 30-32 $^{\circ}$ C., y al cabo de ella se detiene la acción enzimática según señalan NASUNO y STARR (81), es decir, añadiendo por volumen de 10 ml., 0'6 ml. de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ al 9 % y 0'6 ml. de NaOH 0'5 N, el precipitado que entonces aparece se separa por centrifugación a 16.000 r.p.m. durante 15 minutos, y en el sobrenadante se valora la actividad PATE por lectura

a 230 m μ en un Spectrofotómetro Unicam mod. SP 500, series 2. Los resultados se expresan en incremento de densidad óptica.

Además de esta técnica hemos seguido también aquella señalada por AYERS y PAPAVIDAS (6) que se basa en la aparición de un compuesto rosado como consecuencia de la reacción entre el ácido tiobarbitúrico y los dobles enlaces en las moléculas urónicas. Este método utiliza la misma mezcla de incubación que hemos señalado en la técnica anterior y la reacción se efectúa entre 5 ml. de aquella mezcla, 3 ml. de ATB 0'04 M, 1'5 ml. de ClH 1 N, y 0'5 ml. de H₂O. Después de mantener en baño hirviente durante 30 minutos, se enfría hasta temperatura ambiente y el color desarrollado, reflejo de la actividad enzimática, se valora por lectura en Spectrofotómetro a 548 m μ . También en este caso los resultados se expresan en incremento de D.O.

4: Pectintranseliminasa_(PTE)

Es un enzima muy semejante al último de los descritos, del que se diferencia en la naturaleza del sustrato que en lugar de ser ácido péctico como en aquel, es pectina.

Los métodos de valoración son en todo idénticos a los ya indicados, basados así mismo en las propiedades de los dobles enlaces que aparecen como consecuencia de la actividad del enzima. Como única diferencia a notar es la lectura a 235 m μ por ser esta zona mas sensible que 230 m μ como se empleaba en la determinación de PATE.

La técnica del ácido tiobarbitúrico es en todo igual para ambos enzimas.

También en este caso se efectuan ensayos para fijar las concentraciones mas adecuadas de sustrato, enzima, medio de cultivo de la bacteria, etc., etc. Y la actividad se indica como aumento de D.O.

B. PRUEBAS EN EL POSIBLE HUESPED

a) Plantas objeto de estudio

Como huesped para estudiar el poder infectivo de E. carotovora hemos buscado plantas de familias botánicas muy distantes como son solanáceas, leguminosas, crucíferas y compuestas. Y después de observar su comportamiento hemos decidido utilizar para el presente estudio tres plantas que responden de tres formas distintas al ataque producido por la bacteria que se considera. Estas plantas son la col (*Brassica oleracea*) que manifiesta una clara resistencia a la bacteria, la judía (*Phaseolus vulgaris*) capaz de sucumbir a la acción de E. carotovora por destrucción de su parenquima, lo que decide su pérdida de consistencia, seguida del plegamiento de la planta, que en estas condiciones se

seca y muere; y por último, el haba (Vicia faba) que muestra una notable sensibilidad a E. carotovora y en la cual el proceso enzimático que envuelve todo el mecanismo de degradación se complica al intervenir, junto con pectolasas, los enzimas de carácter fenólico que determinan el oscurecimiento de las zonas lesionadas.

b) Cultivo de las plantas

Todas las plantas que utilizamos crecen en macetas de barro de dimensiones que permiten de 2 a 2'5 kg. de suelo. Las semillas se disponen a unos 6-8 cm. de distancia y en número total de 6 a 7. A la vista del desarrollo que alcanzan se retiran 2 ó 3 a fin de que en cada maceta queden aproximadamente 4 plantas que puedan con facilidad alcanzar su evolución normal y llegar al periodo de prefloración, que es el elegido para su estudio.

Este estudio comprende dos aspectos principales: el primero su respuesta a la infección por E. carotovora y el segundo el análisis químico y enzimático antes y después de haber soportado la infección.

c) Técnicas de inoculación

La utilizada con mas frecuencia consiste en preparar una solución acuosa de E. carotovora a partir de un cultivo de 24 horas en agar caldo común, de manera que su concentración corresponda a 6 mg. en peso seco por ml. Esta suspensión se inyecta mediante jeringa tanto en el tallo como en el nervio medio de las hojas, siempre que éstas lo permitan, procediendo con habilidad para evitar cualquier clase de daño.

Otra técnica mas enérgica recoge las bacterias sobre vaselina para formar una pasta que se coloca en la incisión practicada en el tallo con una lanceta de punta fina.

d) Preparación de cortes histológicos

Se utilizan trozos de tallos jóvenes obtenidos de la zona media, que se cortan con microtomo de congelación Leitz Wetzlar de forma que su espesor sea de unas 5-8 u. Para su observación en microscopio de luz, hemos utilizado diversas técnicas de tinción, de

las cuales las mas acertadas han sido las que utilizan colorantes básicos que permiten diferenciar las sustancias pécticas, de celulosas y otros compuestos vegetales. Los mejores resultados los hemos obtenido con safranina, azul de metileno y rojo de rutenio. Este último colorante ($\text{Ru}_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4 \cdot 7\text{NH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) nos ha proporcionado excelentes diferenciaciones del tejido vegetal empleado en soluciones saturadas y recién preparadas, con lo que las sustancias pécticas aparecen teñidas en color rojo rosado según indica JOHANSEN (57).

e) Determinación de compuestos químicos

1: Proteína

Extracción.

La extracción de las proteínas vegetales, se practica por el método que indican HEITFUSS y col. (50).

100 gramos de planta fresca se trituran finamente a 4° C. y se mezclan con 140 ml. de tampón fosfato 0'05 M a pH 7'5, homogeneizando intensamente. La pulpa resultante se prensa y pasa por doble gasa. El ex-

tracto así obtenido se centrifuga a 17.000 g. y 4° C., durante 30 minutos y el sobrenadante se congela en mezcla de hielo + alcohol, después se funde y se vuelve a centrifugar a 20,000 g.

Se retira una muestra para determinar nitrógeno y el resto se dializa 24 horas en el medio de extracción que se cambia varias veces.

Después de dializar se centrifuga a 20.000 g. y 4° C. durante 20 minutos y el sobrenadante se conserva a -20° C. hasta el momento de su uso.

Valoración.

El nitrógeno se determina por el clásico método de Kjendahl, empleando tres volúmenes distintos de la muestra que se valoran por triplicado, para obtener luego los valores medios y expresarlos en tanto por ciento.

Para determinar la proteína es preciso que el extracto se muestre totalmente incoloro con el fin de que no interfiera las lecturas del espectrofotómetro. Por ello la ligera coloración que presenta se elimina tratándolo con carbón activo en la proporción de 1 gramo de carbón por gramo de tejido fresco. El tratamiento se hace a 3^o C. y en la oscuridad durante quince minutos. Separado el carbón por centrifugación, se diluye al décimo el extracto obtenido, y la valoración en él de proteína se hace siguiendo el método de LAYNE (69) y empleando una curva patrón conseguida con albúmina bovina. Los resultados se expresan en mg. de proteína por gr. de peso fresco de planta.

2: Aminoácidos libres

Extracción.

El método que seguimos es el señalado por ROHRINGER y col. (91) que utilizan alcohol absoluto en la proporción de 4 ml. por gramo de tejido fresco. La mezcla se homogeneiza perfectamente por trituración del tejido vegetal y se calienta a B.M. hirviendo du-

rante unos tres minutos. Después de 24 horas se filtra y el residuo se somete un par de veces a extracción alcohólica, combinando a continuación todos los extractos que seguidamente se evaporan a sequedad para volver a disolverlos en etanol de forma que la concentración final corresponda a 2 gramos de tejido fresco de planta por mililitro.

Identificación.

La identificación de los aminoácidos libres, extraídos según hemos indicado, se efectúa por cromatografía en papel Whatman nº 1 utilizando diferente tipo de solventes y reveladores según la naturaleza de los aminoácidos que se desean detectar. En todo caso se utiliza una colección patrón de aminoácidos conocidos, que se disuelven previamente en alcohol isopropílico al 10 % alcanzando una concentración de 0'01 M.

El análisis de aminoácidos totales se practica empleando el solvente que indican ROHRINGER y col, (91), es decir, n-butanol: ácido fórmico: agua (75:13:12) en una cromatografía descendente de triple resolución.

Para el revelado se emplea el revelador de MOFFAT y col. (79) que consiste en dos soluciones que se combinan en el momento de su empleo en la proporción de 25 a 1'5. La primera de ellas está formada por una mezcla de 50 ml. de ninhidrina al 0'2 % en alcohol absoluto, 10 ml. de ácido acético glacial y 2 ml. de 2,4,6-collidina y la segunda consiste en una solución alcohólica al 1 % de nitrato cúprico.

El cromatograma tratado con este reactivo se seca un par de minutos a 105° C., con lo que aparecen los aminoácidos coloreados en diversas tonalidades, que facilitan notablemente su identificación.

En los casos en que se precisa aclarar la presencia de determinados aminoácidos, hemos recurrido a reveladores especiales capaces de diferenciar compuestos de difícil identificación. Así para definir prolina e hidroxiprolina se emplea una solución de isatina al 0'2 % en acetona, que hace aparecer a estos compuestos en color azul brillante (103).

El revelado de serina y treonina se lleva a cabo mediante el reactivo de Nessler llevado a saturación con IO_4Na , que determina la aparición de estos aminoácidos en manchas amarillas, (12).

Para diferenciar cistina y cisteina se emplea un reactivo que se obtiene mezclando volúmenes iguales de las dos soluciones siguientes:

- a.- 1'5 gr. de nitroprusiato sódico se disuelven en 5 ml. de SO_4H_2 2 N, se añaden 35 ml. de metanol y 10 ml. de amoniaco al 28 %.
- b.- 2 gr. de CNNa se disuelven en 5 ml. de agua completando con metanol hasta 100 ml.

Los aminoácidos cistina y cisteina aparecen en color rojo fusia fuerte (121).

3: Sustancias reductoras

Extracción y determinación.

Para extraer las sustancias reductoras hemos seguido el método de INMAN (53).

El tejido de la planta finamente triturado se extrae en tres tiempos con 50 ml. de etanol al 80 %. Se filtra por papel para separar los restos de tejido y se mezclan los extractos. Estos se diluyen hasta 200 mililitros con etanol de 80 % y se clarifican añadiendo 1 gramo de carbón activo por gramo de peso fresco de planta y manteniéndolo en agitación a 3º C. durante quince minutos. El carbón se recupera por filtración a vacío y se lava con 5 ml. de agua destilada que se añaden al extracto clarificado. Se neutraliza el extracto y se evapora hasta unos 5 ml. a presión reducida. El matraz de reducción se lava con tres porciones de 2 ml. de agua destilada que se añaden al extracto. Este se vuelve a neutralizar y el producto así obtenido se emplea para

la determinación de grupos reductores que se practica siguiendo el método de SOMOGYI-NELSON(105).

La lectura de todas las muestras preparadas se hace a 520 μ en un espectrofotómetro Unicam SP 500 series 2, expresándose los resultados en mg. de glucosa por gramo de planta fresca, para lo cual utilizamos una curva patrón de glucosa entre los límites de 10 a 600 μ g.

4: Azúcares libres

Extracción.

La técnica mas eficaz entre las ensayadas es la que indican ROHRINGER y col. (91) que además de su sencillez nos ofrece la ventaja de proporcionarnos juntamente material para la determinación de aminoácidos, lo que supone un notable ahorro de tiempo y material. El detalle de su ejecución lo hemos reseñado anteriormente.

Determinación.

Se realiza una determinación cualitativa por cromatografía descendente, empleando papel Whatman nº 1, y como solvente la mezcla indicada por LATO y col. (68) formada por n-butanol:etil-acetato:isopropanol:ácido acético:agua (35:100:60:35:30). Como testigos se utilizan una serie de soluciones de diversos azúcares disueltos en agua destilada en la concentración de 2 mg. por ml.

Como reveladores empleamos dos reactivos diferentes, recurriendo a uno u otro según la naturaleza de los componentes existentes en el extracto. Sus fórmulas son:

- a.- 4'65 gr. de anilina y 8 gr. de ácido ftálico se disuelven en 500 ml. de n-butanol saturado con agua.
- b.- 20 mg. de nafto-resorcinol se disuelven en 10 ml. de etanol que contiene 0'2 ml. de SO_4H_2 concentrado(68).

Después de tratado con el revelador elegido, se mantiene el cromatograma a 100-105° C. unos minutos, con lo que los azúcares presentes se manifiestan en forma de manchas de distintas tonalidades.

5: Sustancias pécticas

Extracción.

Para extraer las sustancias pécticas de la planta empleamos la pulpa resultante del tratamiento con etanol, que elimina los aminoácidos y azúcares, con lo cual el mismo material vegetal nos proporciona con mayor facilidad y pureza los componentes pécticos.

La pulpa que hemos señalado se pone en un mortero para facilitar la evaporación del alcohol lo que se completa manteniéndola unos minutos en estufa a 100° C. A continuación se trata con etanol-eter (v/v) y finalmente con eter, se prensa y seguidamente se suspende en agua, en la proporción de 50 ml. por gramo de material seco, agitándose de 5 a 6 horas a 20° C. y empleando arena para facilitar la extracción. Por último se suspende el residuo en HCl 0'05 N y se calienta en B.M. a 80° C. durante dos horas, con agitación periódica. Este tratamiento se repite de 3 a 4 veces mezclando al final todos los extractos.

Determinación.

La valoración del material péctico se ha intentado por técnicas diferentes: de tipo gravimétrico, basadas en lecturas de rotación óptica y de tipo químico por coloración con carbazol. De todas ellas ha sido la última indicada la que nos ha proporcionado resultados mas reproducibles por lo que fue la elegida para efectuar las medidas, de acuerdo a la técnica que puntualizan Mc. COMB y Mc. CREADY (16) y que consiste, en líneas generales, en mezclar en baño de hielo 2 ml. de la muestra con 12 ml. de SO_4H_2 concentrado y después de calentar en B.M. hirviendo 10 minutos, se enfria a 20°C . y se añade a cada muestra 1 ml. del reactivo de carbazol al 0'15 %. La intensidad de color se lee a 520 m μ en un espectrofotómetro Unicam SP 500 series 2. Los resultados se calculan sobre una curva patrón construida con ácido galacturónico entre 10 ug. y 0'1 mg., y se expresan en mg. de ácido galacturónico por gramo de peso fresco de planta.

6: Derivados fenólicos

Extracción.

La extracción de las sustancias fenólicas se practica por el método seguido por HOBSON (51).

100 gramos de tejido fresco finamente triturado se llevan sobre metanol caliente y se hierve durante 1 minuto. Se deja en maceración durante 1 hora con suficiente metanol para cubrir el tejido y se repite la extracción hasta tres veces. Los líquidos filtrados se combinan y se evaporan hasta 50 ml. a presión reducida y a temperatura inferior a 40° C. El pH del concentrado se ajusta a 8'3 con NaOH 1N, y se añade un exceso de solución saturada de acetato de plomo, manteniéndolo durante una hora a 0° C. El precipitado que aparece se centrifuga, se lava, y se suspende en 50 ml. de agua. El pH de esta suspensión se lleva a 3 con SO_4H_2 2N, y se filtra para separar el precipitado. El líquido filtrado es el que se utiliza para el análisis.

Determinación.

Los compuestos fenólicos extraídos según queda indicado, se analizan por cromatografía monodimensional descendente en papel Whatman nº 1, empleando como solvente n-butanol:ácido acético:agua (4:1:5). La presencia de fenoles se revela por observación a la luz diurna y con U.V. antes y después de exponer los cromatogramas a vapores de amoníaco. Además de este procedimiento hemos utilizado varios reveladores, que son:

a.- p-nitroanilina: se prepara mezclando los siguientes componentes en el mismo orden en que se describen.

1. 0'5 gr. de p-nitroanilina en
100 ml. de ClH 2N 2 ml.
2. Nitrito sódico al 5 % . . . 3 a 5 gotas
3. Acetato sódico al 20 % 8 ml.

Después de tratar el cromatograma con este revelador se puede someter a la acción de CO_3Na_2 al 15 %, produciéndose entonces nuevas coloraciones.

b.- Vainillina clorhídrica: se prepara disolviendo 1 gr. de vainillina en 10 ml. de ácido clorhídrico concentrado.

c.- Cloruro férrico: se prepara disolviendo 3 gr. de Cl_3Fe en etanol, las catequinas adquieren color verde oscuro o azul, según indica De MIGUEL (78).

7: Determinación de humedad

Se determina manteniendo las muestras en estufa de desecación a 80° C. hasta peso constante utilizándose también los resultados para el cálculo de peso seco.

8: Determinación de pH

La determinación del pH en el tejido vegetal, se hace por el método de FRIEDMAN y CEPONIS (32), que consiste en triturar el tejido fresco con agua destilada en un mortero, en la proporción de 10 gr. de planta por 12 ml. de agua. Se filtra por gasa y se mide el pH en un pHmetro Coleman.

f) Determinación de enzimas vegetales

1: Método de extracción

El método de extracción de enzimas que seguimos, en todas las plantas utilizadas, es el que indica SWIMBURNE (114) que emplea solución 0'25 N de ClNa. Todas las operaciones se efectúan a 4º C. y el producto final se conserva en congelador hasta el momento de usarlo.

Se procede pesando el material fresco, antes de triturarlo con la solución de ClNa en la proporción de 1 gramo por 1 mililitro. A continuación se filtra por gasa y se centrifuga a 3.000 r.p.m. en centrífuga refrigerada durante 20 minutos. Después de dializar en agua se vuelve a centrifugar y el sobrenadante obtenido es el empleado para las determinaciones enzimáticas.

2: Valoración de PG

La técnica ensí no ofrece ninguna variación respecto a la señalada en la parte correspondiente a "Pruebas en el patógeno". Se sigue el mismo método de JANSEN y Mc. DONNELL (55) que se practica a dos valores de pH , 5'5 y 9'3, como consecuencia de haber observado la variación de acidez que decide el proceso infectivo.

Los resultados se expresan en mg. de ácido galacturónico por gr. de peso fresco de la planta.

3: Valoración de PE

Este enzima se analiza según el método de DEESE y STAHMANN (21) basado en la determinación de la acidez que aparece como consecuencia de la actividad enzimática. El ensayo se practica a dos pH distintos, empleando como tampones citrato-fosfato pH 5'5 ó Tris-HCl de pH 9'3. El volumen final de la mezcla de incubación es de 15 ml. y contiene ClNa 10M, 1 % de pectina de man-

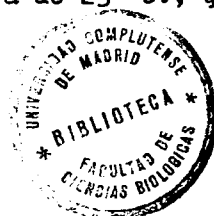
zana y 3'4 % en peso fresco de la planta estudiada. Esta mezcla se mantiene a 30° C. durante tres horas, neutralizando con NaOH 0'025 N la acidez que se produce. La actividad se calcula en microequivalentes de grupos metoxi liberados en una hora, referido a gramo de tejido fresco.

4: Valoración de PATE y PTE

Se siguen los métodos señalados en la parte de "Pruebas en el patógeno", empleando en la mezcla de incubación los mismos factores que allí reseñamos, con la única diferencia de que aquí el producto enzimático es suministrado en forma de extracto vegetal y en una proporción de 0'25 gr. por mezcla de 10 ml. El pH a que se efectúan las pruebas es de 8'6 y la actividad se conoce por lectura en espectrofotómetro a 230 mμ para PATE y a 235 mμ para PTE, así como a 548 mμ después de la reacción con el ácido tiobarbitúrico de los productos resultantes de la acción de ambas enzimas sobre sus sustratos específicos.

5: Valoración de fenolasas

Para conocer la actividad de fenolasas vegetales, empleamos el método de MAXWELL y BATEMAN (77) activando el extracto con ácido péctico según indican DEVERALL y WOOD (24). El detalle del método es como sigue: la solución activadora contiene 1'4 mg. de ácido poligalacturónico por ml. de tampón cítrico-fosfato pH 4'5. Un volumen de 0'14 ml. de esta solución se mezcla con 0'2 ml. del extracto vegetal, 0'6 ml. de agua y 0'06 ml. del tampón pH 4'5 y se mantiene el conjunto a 18-20° C. durante 15 minutos. Finalizada la activación se procede a la medida del enzima, para lo que se emplea como sustrato una solución $10^{-3}M$ de pirocatequina, completando la mezcla de incubación a 6 ml. con un volumen de extracto activado correspondiente a 0'25 gr. de peso fresco de tejido vegetal y con tampón fosfato pH 7'0. La determinación de actividad se realiza por lectura en espectrofotómetro Unicam a 485 m μ , cada 30 segundos y durante un periodo de tiempo de dos horas y se expresa por el cambio de absorción a una temperatura de 23° C., que es a la que se efectúa la experiencia.



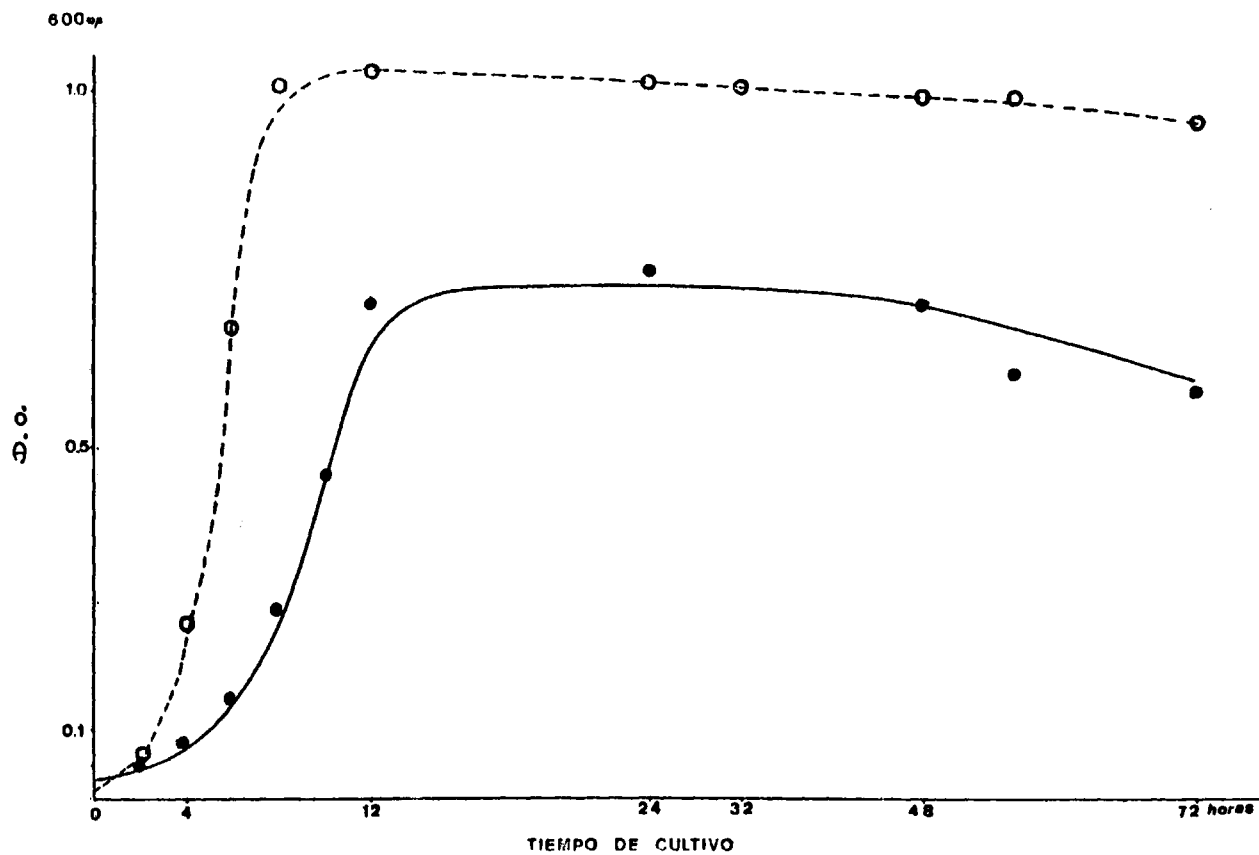
III. RESULTADOS

A.

PRUEBAS EN EL PATOGENO

- a) Las exigencias nutritivas de Erwinia carotovora quedan cumplidas satisfactoriamente en el medio señalado por Smith (S), donde la bacteria alcanza el final de su fase logarítmica a las 8 horas de inoculación. También en el medio CG crece con facilidad, si bien acusa una fase lag mas prolongada, llegando al final de la logarítmica después de 13 horas de cultivo. La figura nº 1 muestra la curva de crecimiento en ambos medios durante 72 horas de incubación a 25º C. y en agitación.

El control permanente al que es sometida cada una de las fases de nuestras experiencias, revela la pureza del cultivo y el aspecto normal en la morfología de la bacteria. Prueba de uno de estos controles



- 70 -

Fig. nº 1.- Desarrollo de E. carotovora en medio S (o—o) y en medio CG (●—●), a 25° C. y en agitación, en función del tiempo de cultivo.

es la figura nº 2, donde puede apreciarse con todo detalle el aspecto de uno de los inóculos empleados para sembrar el medio S en el que se observó el desarrollo de E. carotovora.

b) Enzimas sintetizados

1: Poligalacturonasa (PG)

Por tratarse de un exoenzima su estudio se realiza en el mismo medio en que E. carotovora cultiva, del que se eliminan todas las formas bacterianas por centrifugación a 3.000 r.p.m. La presencia en la mezcla de incubación de FNa garantiza la imposibilidad de evolución de cualquier forma celular.

En la primera prueba hemos utilizado cultivos procedentes del medio S, en volúmenes que han oscilado entre 0'2 y 10 ml., con el fin de observar la dosis mas conveniente a emplear en ensayos posteriores. Ante los resultados que aparecen en la figura nº 3 de-

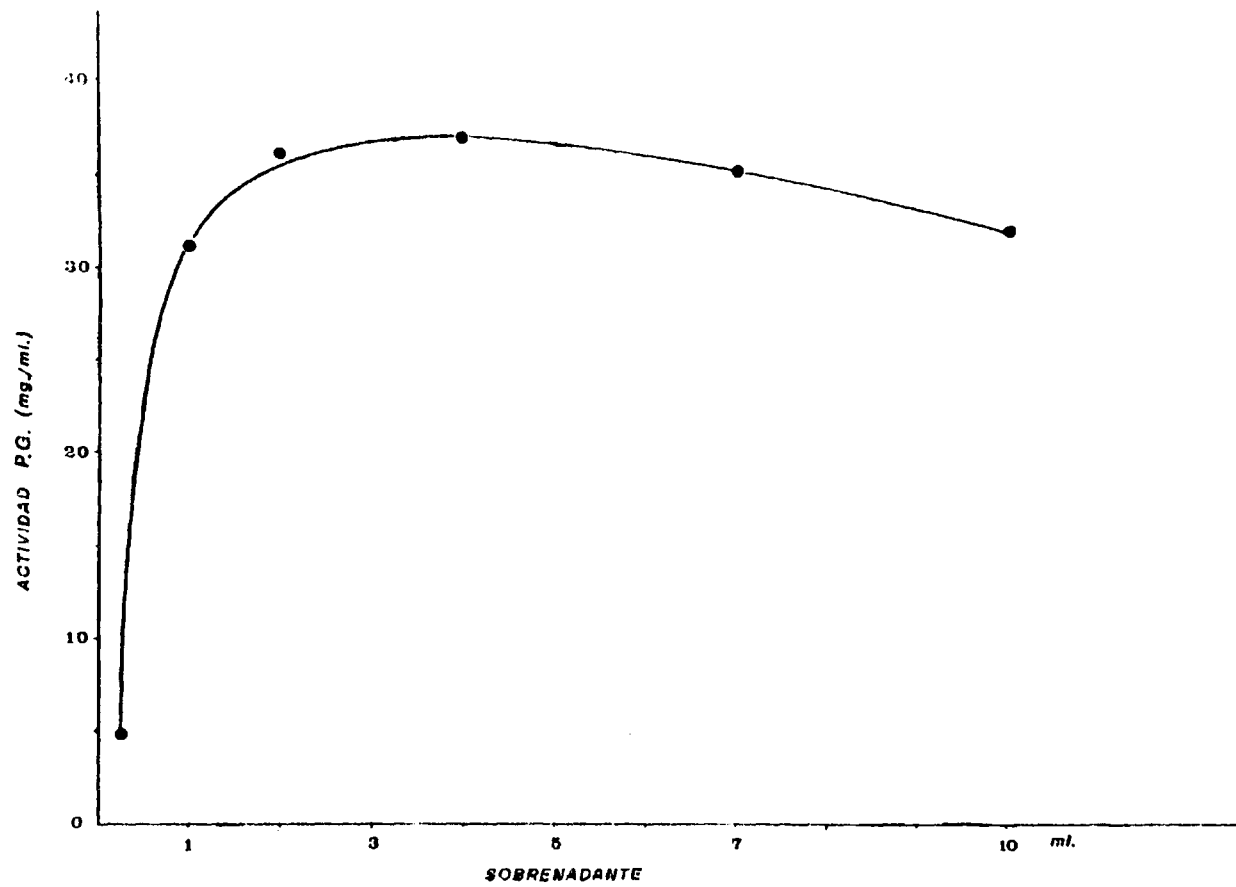


Fig. nº 3.- Actividad PG en sobrenadante de un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio S.

cidimos utilizar 1 ml. para los 20 ml. que totalizan la mezcla de incubación.

La relación enzima/sustrato nos la dio una nueva experiencia en la que fijando en 1 ml. el volumen del sobrenadante procedente de un cultivo de 24 horas en medio S, hicimos que el sustrato variase de 0'1 a 1'2 %. La figura nº 4 recoge los resultados, que nos señalan cómo va aumentando la actividad con la concentración de pectato hasta alcanzar un máximo alrededor del 0'75 %, máximo que se mantiene a concentraciones mas elevadas de sustrato que llegan hasta 1'2 %. Decidimos por lo tanto emplear en futuras determinaciones una concentración de pectato sódico de 0'75 % frente a la riqueza en enzima que aporta 1 ml. del líquido metabólico de la bacteria que consideramos.

Deseando conocer la forma en que el enzima PG es sintetizado y excretado por E. carotovora nos decidimos a estudiar su presencia en el medio en que se desarrolla la bacteria, relacionándola con la edad del cultivo. La figura nº 5 recoge los resultados, que

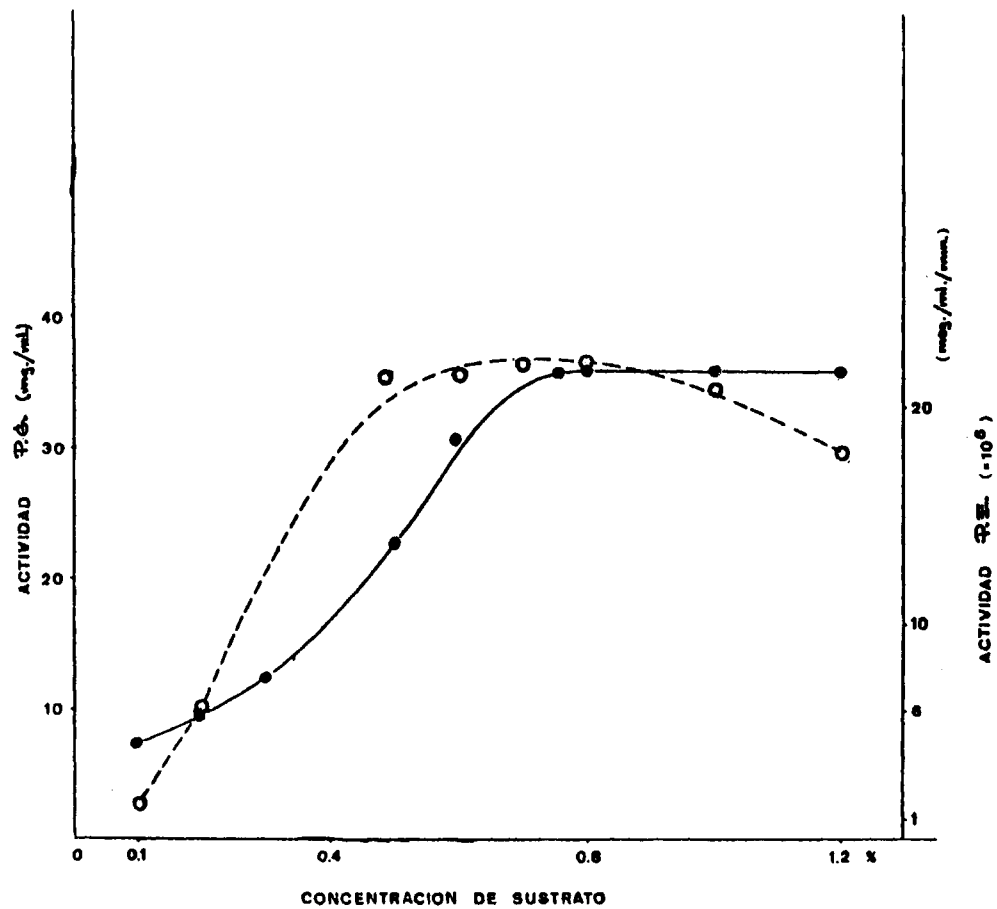


Fig. nº 4.- Efecto de la concentración de sustrato en la actividad PG (o—o) y PE (o—o) del sobrenadante de un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio S.

nos indican cómo la producción del enzima es rápida hasta alcanzar un valor máximo hacia las 12 horas, valor que se mantiene constante durante las 48 horas de duración del ensayo. Teniendo en cuenta la curva de crecimiento de E. carotovora en el medio S, podemos deducir que es en la fase logarítmica en la que se inicia la síntesis enzimática, que va aumentando con el crecimiento de la bacteria hasta alcanzar su mas alto valor al final de dicha fase, transcurrida la cual las cifras de producción de enzima no ofrecen variación apreciable.

Queda por tanto establecido, que la mezcla de incubación mas conveniente para efectuar los ensayos de PG es la que contiene 0'75 % de pectato sódico como sustrato y como enzima la cantidad presente en 1 ml. del sobrenadante obtenido a partir de un cultivo de Erwinia carotovora que ha alcanzado su fase logarítmica.

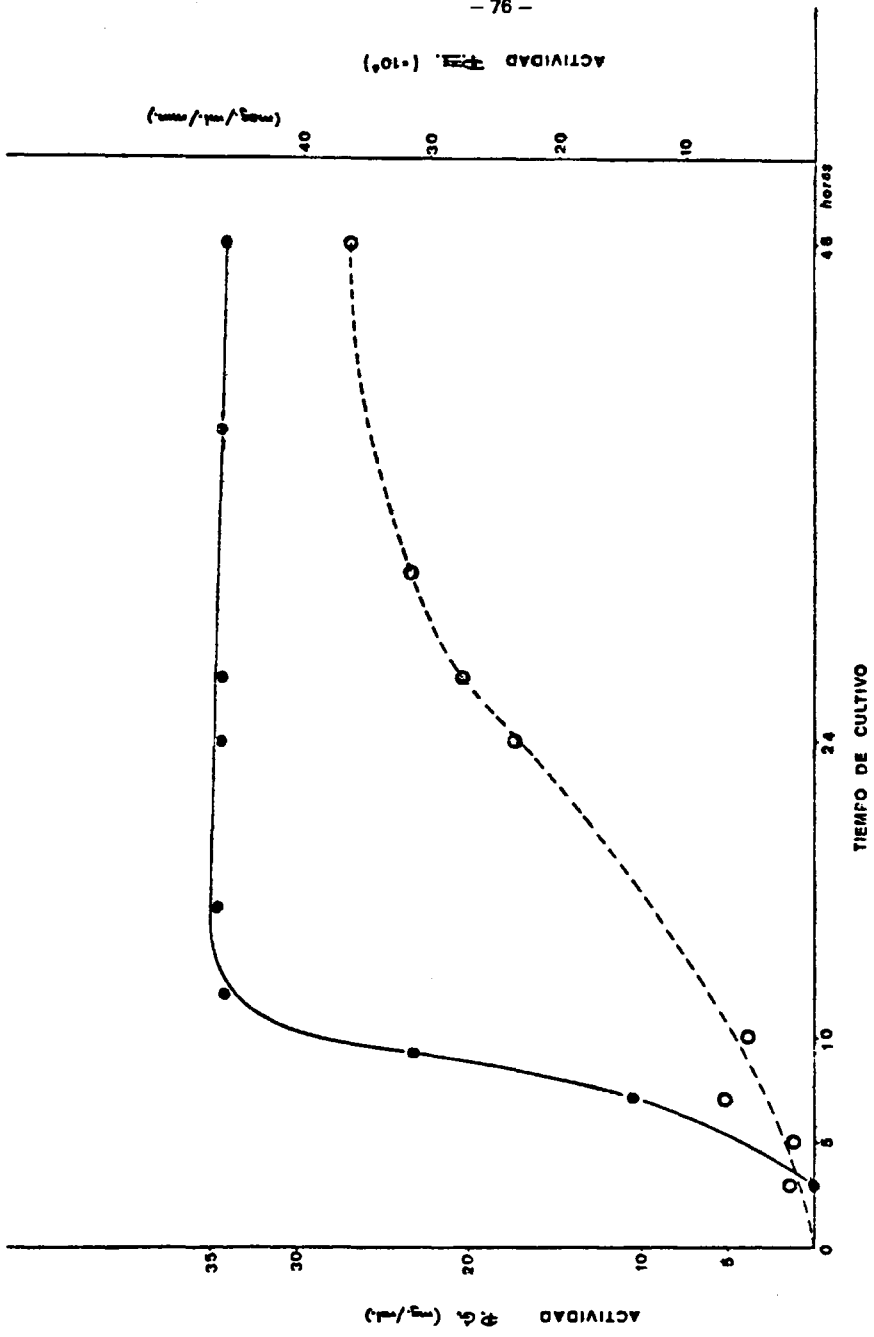


Fig. nr 5.- Síntesis de PG (o—o) y de PE (o---o) por E. carotovora en medio S, con relación al tiempo de cultivo.

2: Pectinesterasa (PE)

Con relación al enzima pectinesterasa hemos efectuado así mismo, experiencias semejantes a las indicadas en el caso anterior. La concentración óptima de sustrato se determina por valoración de la actividad de 10 ml. de sobrenadante procedente de un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio Smith, cuando la cantidad de pectina presente en la mezcla de incubación varía de 0'1 a 1'2 %. Los resultados que aparecen en la figura nº 4, demuestran que este enzima alcanza su máxima producción cuando la concentración de pectina oscila alrededor de 0'5 %, mientras que a partir de 0'9 % se manifiesta una inhibición, por exceso de sustrato, que aumenta proporcionalmente con la concentración del mismo.

Si pasamos a considerar la síntesis de PE con relación a la edad de la población bacteriana, podemos deducir, según los datos que muestra la figura nº 5 que el enzima se detecta en valores muy bajos durante las primeras horas de cultivo de Erwinia carotovora y es en la proximidad de las 20 horas cuando se manifiesta en cantidad mas notable, cantidad que sigue incrementando paulatinamente hasta alcanzar una fase de estabilidad a partir de las 48 horas. La figura indicada proporciona una clara idea del proceso de síntesis de los dos enzimas hasta ahora considerados, es decir PG y PE.

3: Acido péctico transeliminasa (PATE)

Las determinaciones de actividad de este enzima se efectúan, según reseñamos en el lugar correspondiente, por lectura de D.O. a 230 mu, así como por intensidad de color que aparece en la reacción con ácido tiobarbitúrico y que se conoce así mismo por el incremento de densidades ópticas a 548 mu. Con el fin de observar la sensibilidad de una y otra determinación exponemos los resultados simultáneamente, lográndose con ello facilitar su comparación.

Para conocer la composición mas adecuada de la mezcla de incubación, comenzamos por modificar en ella el volumen de sobrenadante del cultivo, es decir, el factor que aporta el propio enzima.

El estudio planteado abarca dos ensayos simultáneos: Uno que utiliza muestras procedentes del medio S y el otro en el que las muestras proceden del me-

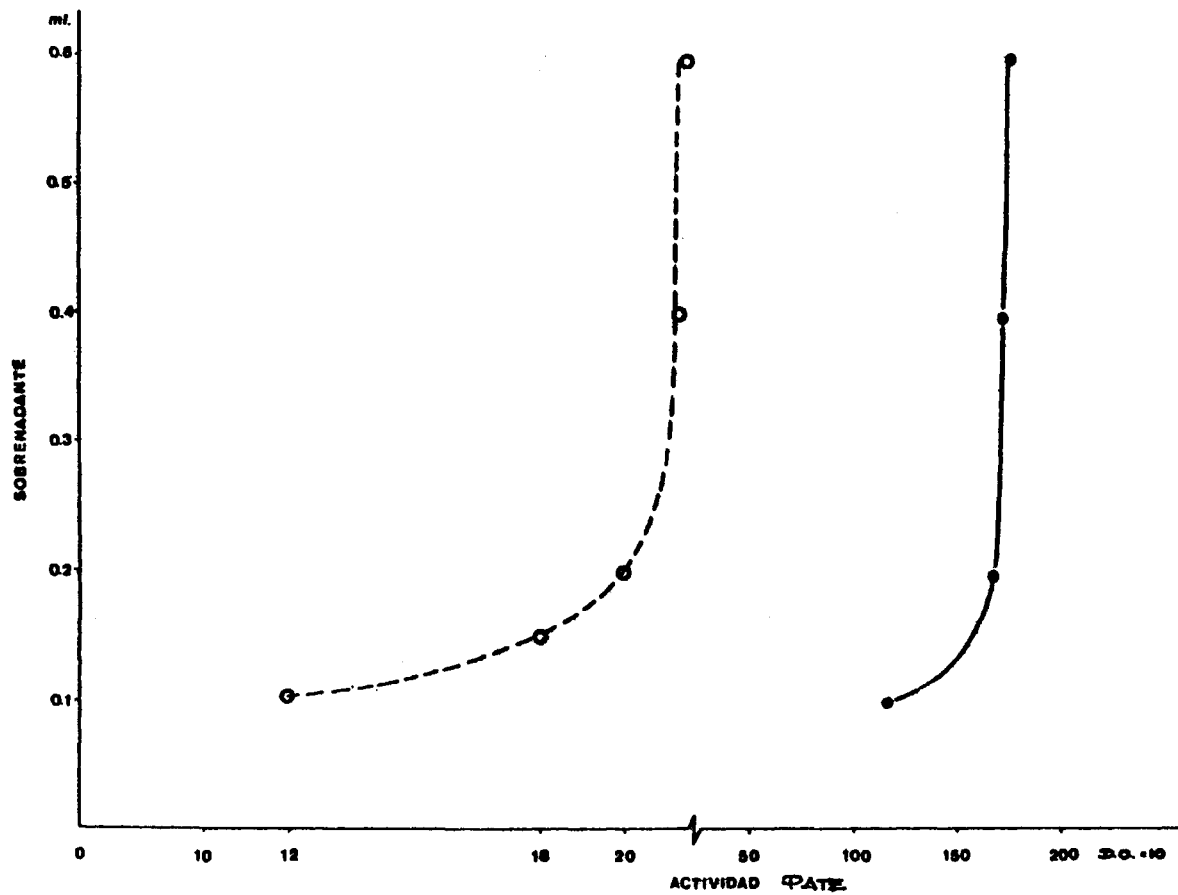
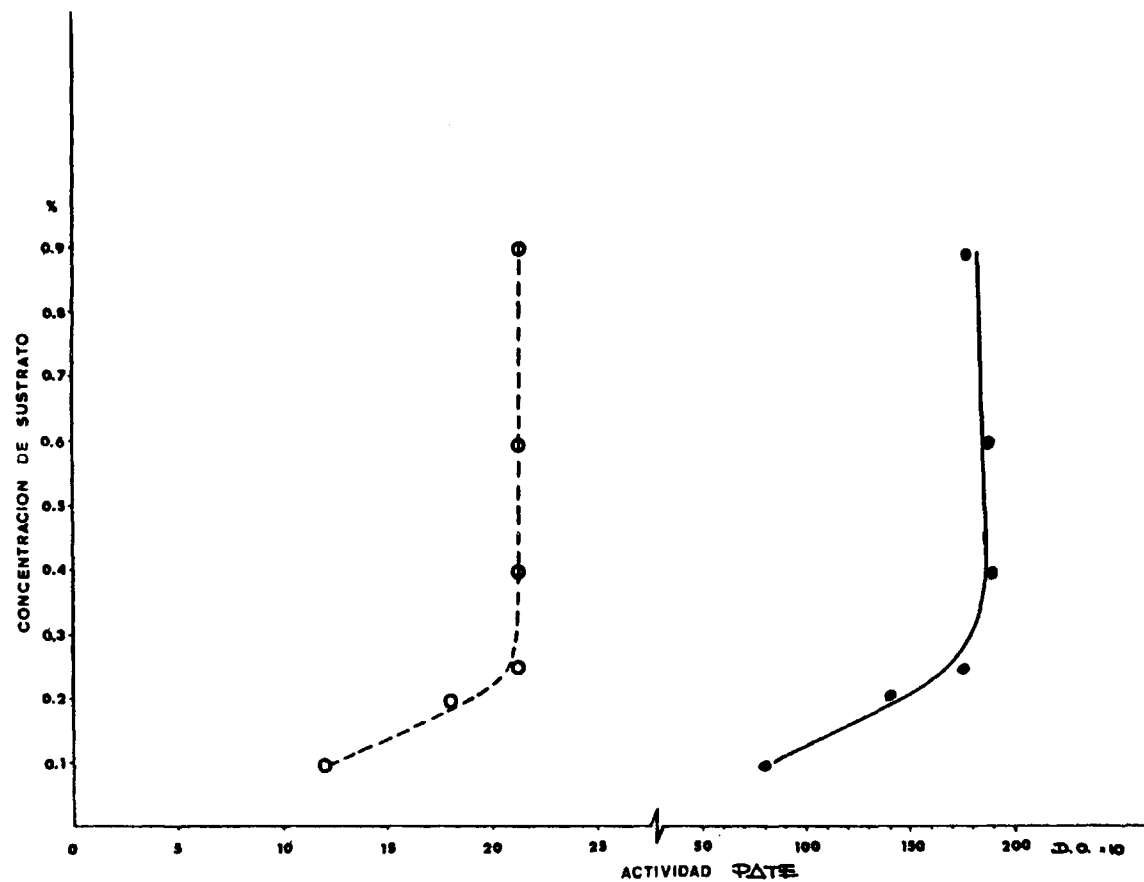


Fig. nº 6.- Actividad PATE de un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio S, medida a 230 mg (o—o) y a 548 (●—●) mg. (La mezcla de incubación contiene 0'25 % de pectato sódico).

dio CG. Describiremos en primer lugar los resultados obtenidos a partir del medio S, e inmediatamente los que corresponden al medio CG.

Como indicamos en su momento, el volumen de la mezcla de incubación es de 10 ml., pues bien, en él, el aporte de enzima hacemos que varíe desde 0'1 ml. a 0'6 ml. y los resultados son los que ofrece la figura nº 6, por la que se deduce que la dosis mas adecuada gira en torno al volumen de 0'2 ml. , tanto si la lectura se hace a 230 mu como si se emplea la D.O. de 548 mu.

Para seguir nuestras experiencias decidimos utilizar como aporte enzimático 0'2 ml. de sobrenadante del cultivo de E. carotovora en medio S, y manteniendo fijo este factor procedemos a modificar la concentración de ácido péctico entre los límites de 0'1 a 0'9 %. Por la figura nº 7 podemos comprobar el aumento de actividad PATE a medida que lo hace el sustrato hasta llegar la concentración de éste a las proximidades de 0'3 %; pero a partir de este valor no se revela mayor



- 82 -

Fig. nº 7.- Efecto de la concentración de sustrato en la actividad PATE de un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio S, medida a 230 (o—o) y a 548 (o—o) milimicras.

actividad, sino que se mantiene constante incluso en presencia de 0'9 % de sustrato.

Todas estas experiencias se han llevado a cabo con el líquido metabólico del cultivo, durante 24 horas, de E. carotovora en medio S; pero hemos creído necesario conocer también la fase de desarrollo en que la síntesis del enzima es mas intensa. Para ello hemos ensayado la actividad PATE con relación al tiempo de crecimiento de E. carotovora, empleando una mezcla de incubación en la que la relación enzima/sustrato es la que se deduce de los experimentos anteriores, es decir 0'25 % de pectato y 0'2 ml. de sobrenadante, en el volumen total de 10 ml. Los datos que este estudio proporciona aparecen en la figura nº 8, y por ello se ve cómo el enzima PATE alcanza el máximo de su producción entre las 8-14 horas, según la sensibilidad del método empleado, es decir, que es durante la fase logarítmica cuando la bacteria acusa mas alta actividad de síntesis enzimática, y transcurrida esta fase, no exis-

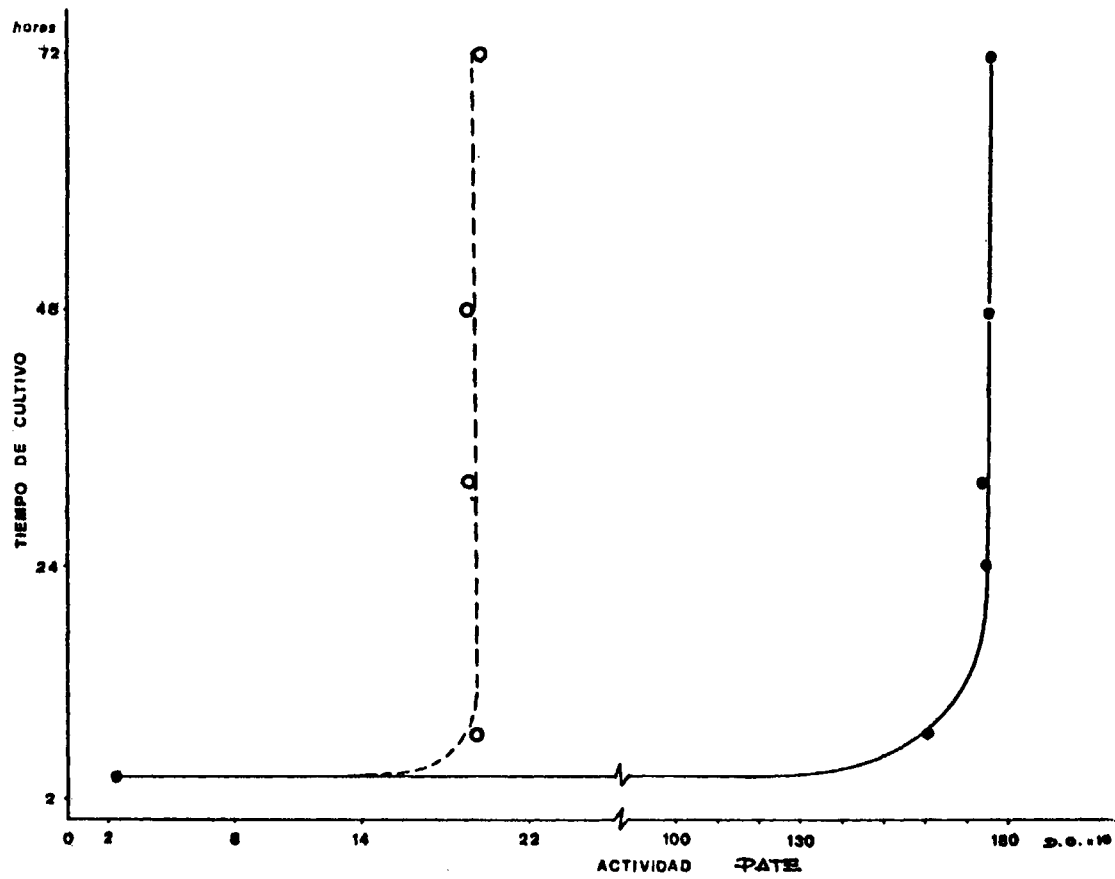
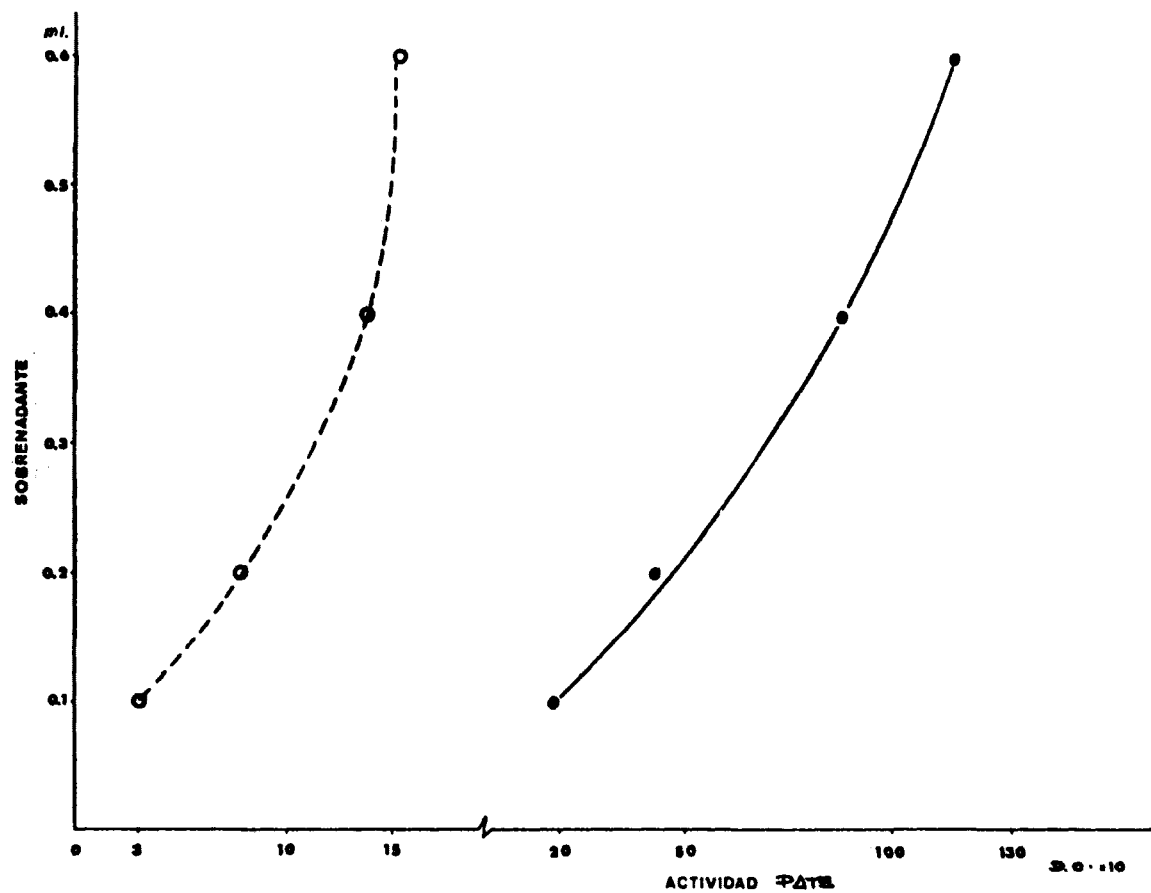


Fig. nº 8.- Producción de PATE por E. carotovora en medio S respecto al tiempo de cultivo, la actividad se determina a 230 (o—o) y a 548 (o—o) mμ.

te estímulo que haga superar los valores ya alcanzados, que se mantienen durante las 72 horas de observación.

A continuación vamos a exponer, según hemos señalado, los resultados del estudio paralelo que efectuamos del enzima PATE cuando E. carotovora se desarrolla en el medio CG. Aunque la multiplicación en este medio es menos acusada por alcanzar un 71 % de la que corresponde al medio S., las experiencias se han planteado empleando las mismas dosis de ambos para facilitar su comparación.

La figura nº 9 presenta las diferencias de actividad cuando varía de 0'1 a 0'6 ml. el volumen de la muestra utilizada. Tanto si la lectura se hace a 548 mu ó bien a 230 mu, no hay duda de que el enzima PATE se encuentra en concentraciones muy bajas, ya que el aumento que se observa en actividad exige incrementos notables de las dosis empleadas, e incluso con la máxima de 0'6 ml. apenas se roza el máximo de actividad PATE.



- 98 -

Fig. nº 9.- Actividad PATE en un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio CG, medida a 230 (o—o) y a 548 (o---o) mu. (La mezcla de incubación contiene 0'25 % de pectato sódico).

Siguiendo la línea comparativa respecto a los resultados obtenidos en el medio S, estudiamos a continuación la concentración mas adecuada de sustrato, empleando como en aquel caso, valores comprendidos entre 0'1 y 0'9 % y un volumen de 0'2 ml. del sobrenadante del medio CG, donde ha cultivado E. carotovora durante 24 horas. Los resultados, aunque mas bajos, recuerdan a los obtenidos con el medio S, y al igual que en aquella ocasión alcanzan pronto un valor máximo como puede observarse en la figura nº 10.

Finalmente pasamos a estudiar la producción de PATE en relación al tiempo de cultivo de la bacteria, consignando los datos obtenidos en la figura nº 11, por la que vemos que su valor es muy bajo y que es a partir de las 24 horas cuando la cantidad de enzima sintetizado se aproxima al máximo, que es alcanzado antes de las 32 horas.

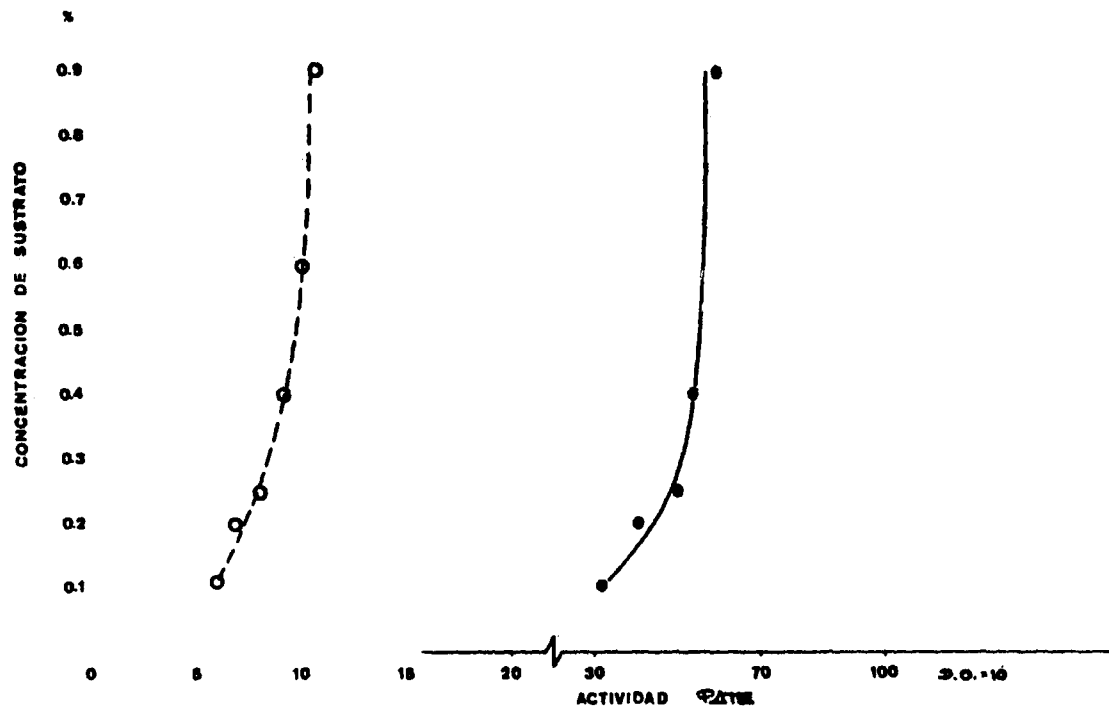


Fig. nº 10.- Efecto de la concentración de sustrato en la actividad PATE de un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio CG, medida a 230 (o—o) y a 548 (o—o) μ .

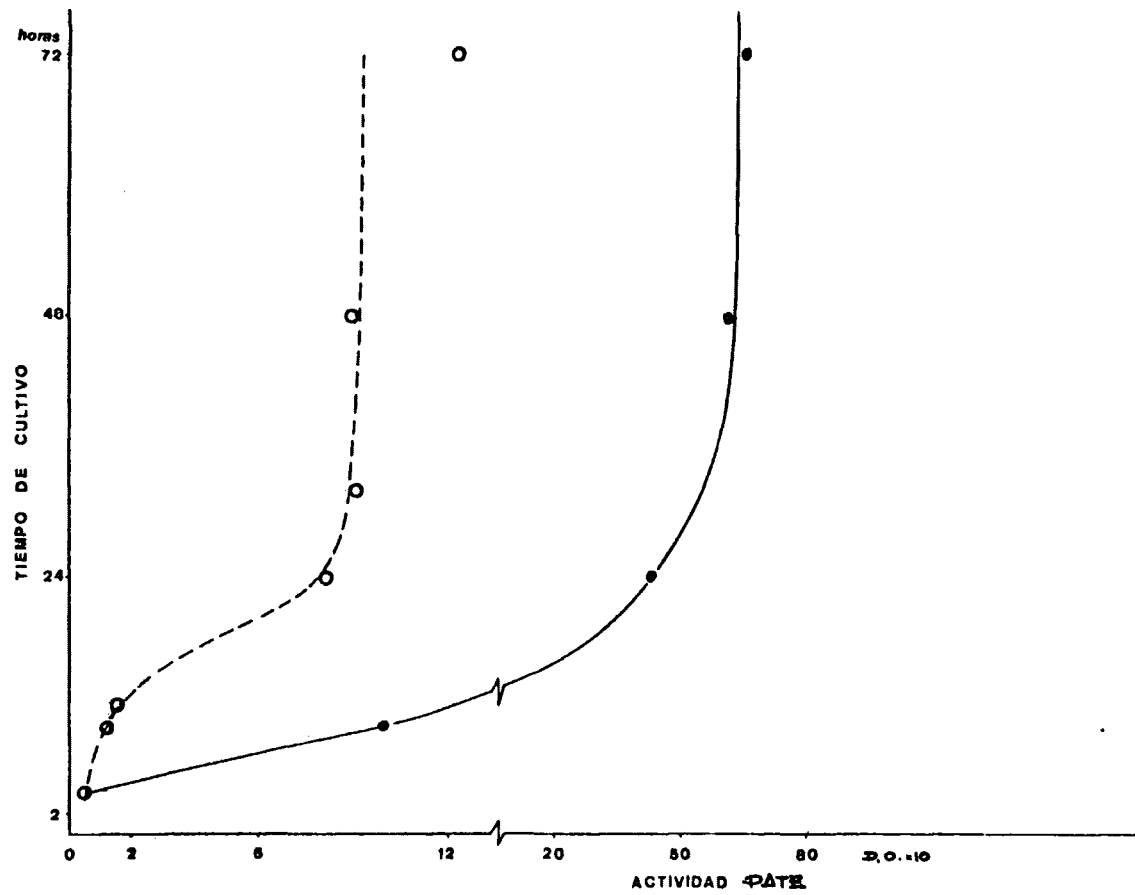


Fig. nº 11.- Producción de PATE por E. carotovora en medio CG durante 72 horas de cultivo, la actividad se determina a 230 (o—o) y a 548 (o—o) mu.

4: Pectintranseliminasa (PTE)

La gran semejanza de este enzima con el que acabamos de considerar nos ha conducido a plantear su estudio siguiendo la misma pauta que queda indicada y cuyos resultados vamos a exponer a continuación.

La figura nº 12 refleja la actividad PTE en relación al volumen de sobrenadante procedente del medio S. Los incrementos de D.O., tanto a 548 mu como a 235 mu reproducen fielmente el proceso, e indican que valores inferiores a 0'2 ml. dan las actividades mas bajas y es precisamente esta dosis de 0'2 la que decide la actividad PTE máxima, que se mantiene sin variación hasta llegar al volumen de sobrenadante de 0'6 ml.

Tomando como concentración de PTE, la que aporta 0'2 ml. de sobrenadante hemos comprobado cual es la relación óptima enzima/sustrato, para lo que hemos variar la dosis de pectina de 0'1 a 0'9 %. Así,

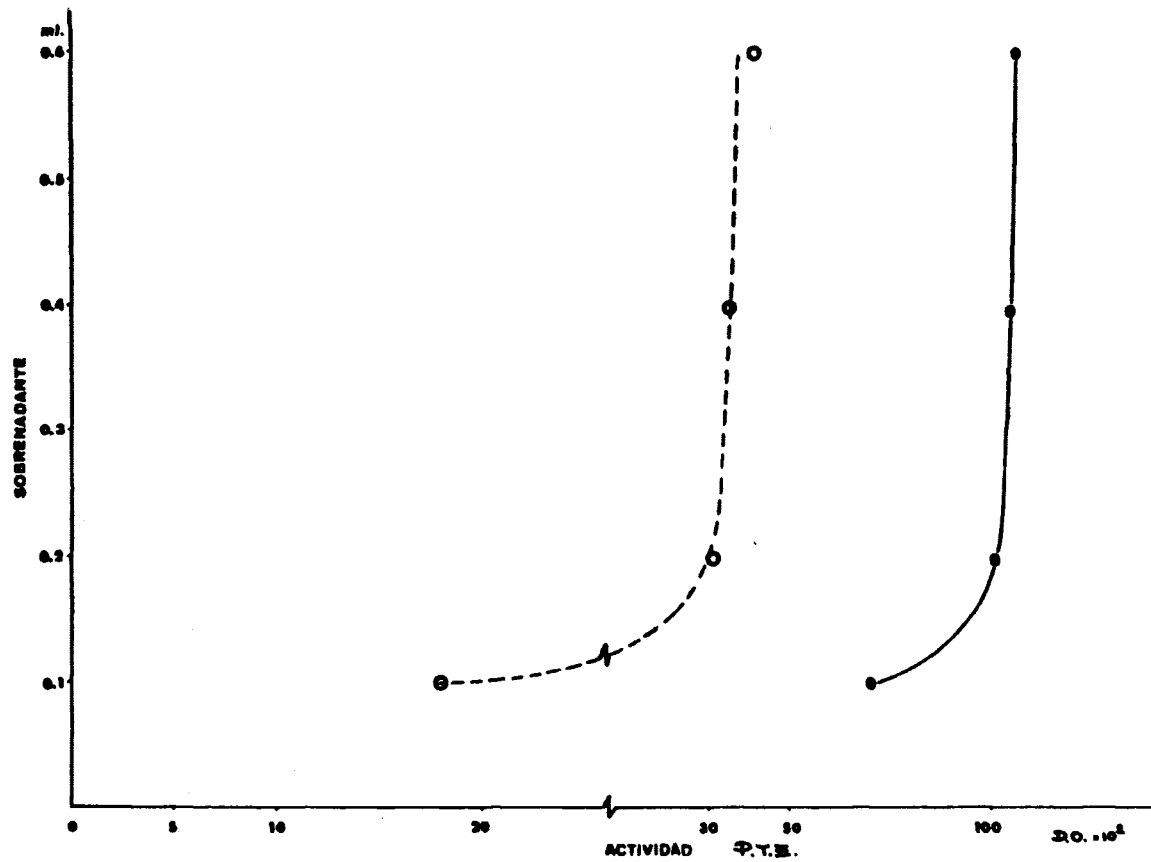


Fig. nº 12.- Actividad PTE en un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio S, medida a 235 (o—o) y a 548 (o---o) mu. (La mezcla de incubación contiene 0'25 % de pectina).

podemos ver, en la figura nº 13, que la concentración de 0'25 % de pectina es la que decide el límite de mayor actividad y que su incremento produce cambios muy ligeros. Es, por tanto, esta concentración, de 0'25 %, de sustrato la que vamos a emplear para conocer el proceso de síntesis enzimática respecto al tiempo de cultivo. El estudio abarca desde 2 horas hasta 72 horas y aparece representado en la figura nº 14. A partir de las 8 horas de ser inoculado con E. carotovora, aparece en el medio S una actividad PTE muy notable que tan solo 6 horas después alcanza su valor máximo, valor que ya se mantiene hasta las 72 horas de duración de la experiencia.

Cuando repetimos estos estudios partiendo del cultivo en medio CG los resultados manifiestan bastante paralelismo con los que acabamos de exponer.

La figura nº 15 reproduce la variación de actividad PTE para distintas cantidades de sobrenadante, y en ella aparece la dosis de 0'2 ml. como responsable de un 64 % de dicha actividad con respecto al máximo

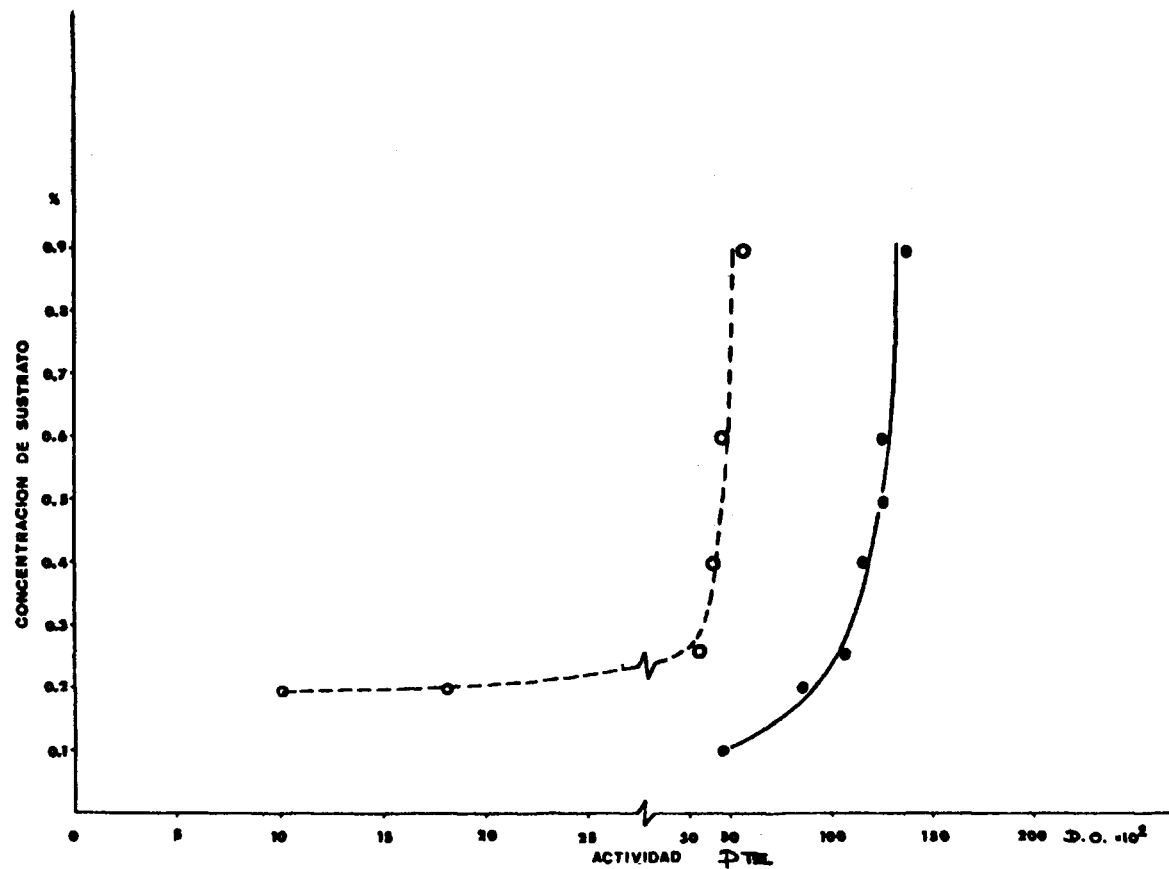


Fig. nº 13.- Efecto de la concentración de sustrato en la actividad PTE de un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio S, medida a 235 (o—o) y a 548 (o—o) μ .

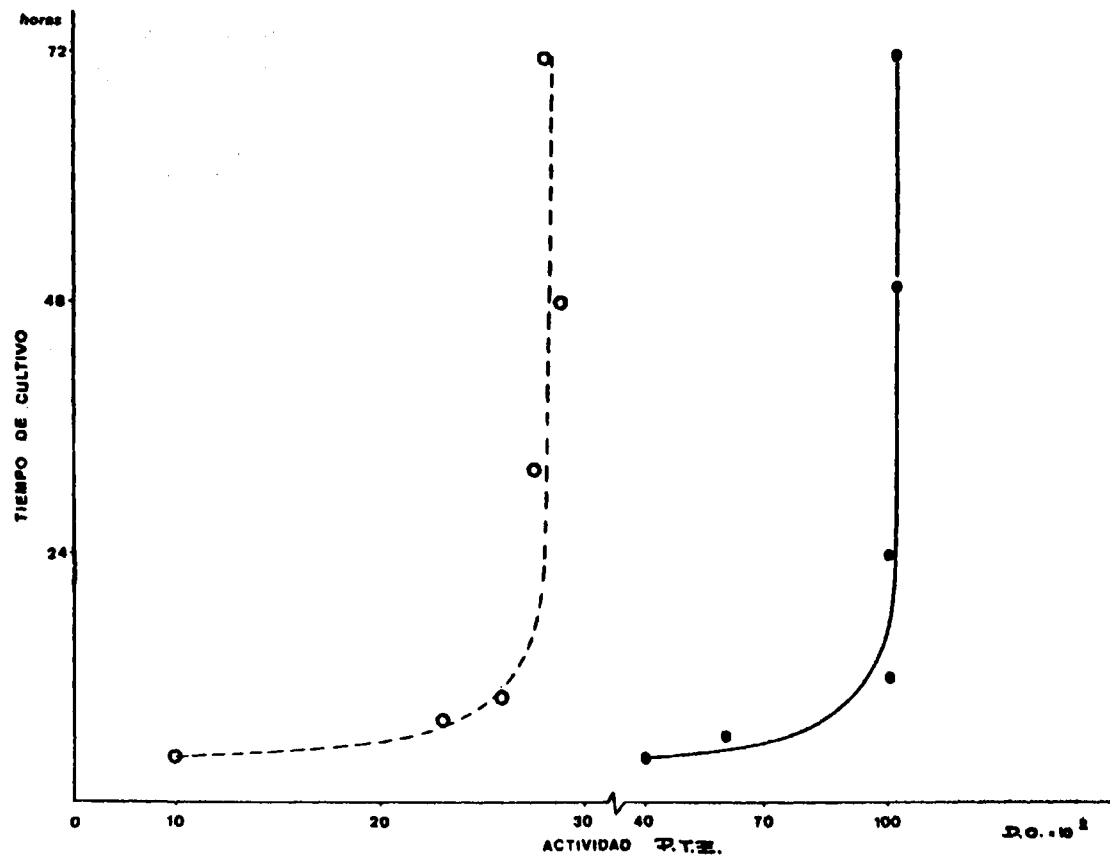


Fig. nº 14.- Síntesis de PTE por E. carotovora en medio S respecto al tiempo de cultivo, medida a 235 (o—o) y a 548 (o---o) μ .

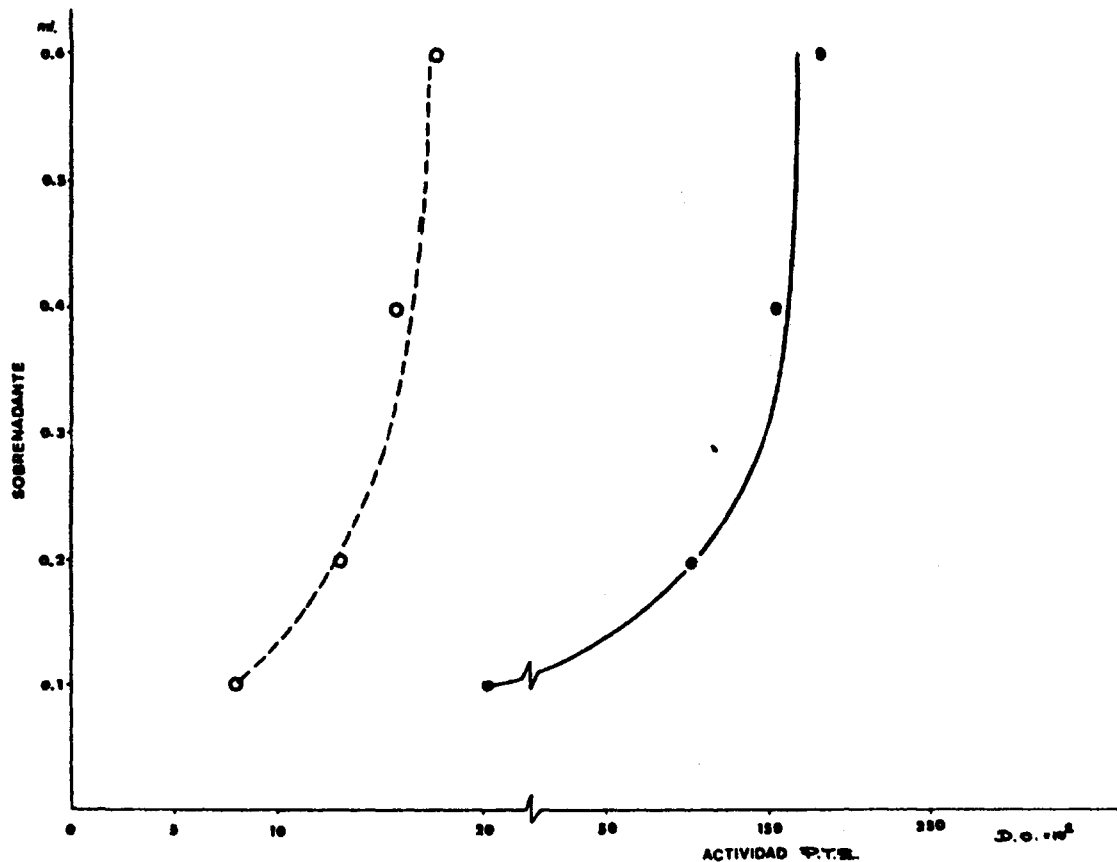


Fig. nº 15.- Actividad PTE en un cultivo de 24 horas de E. carotovora en medio CG, medida a 235 (o—o) y a 548 (o—o) μ . (La mezcla de incubación contiene 0'25 % de pectina).

alcanzado por dosis mas elevadas, que llegan al límite experimental de 0'6 ml.

La relación mas conveniente entre el enzima PTE y su sustrato pectina, es estudiada utilizando una concentración de enzima correspondiente a 0'2 ml. del sobrenadante, que actua sobre concentraciones de sustrato que varían de 0'1 a 0'9 %. La experiencia queda expuesta en la figura nº 16, que expresa el escaso aumento de actividad que supone el triplicar o cuatriplicar la concentración de sustrato con relación a un valor de 0'25 % y el aumento, tampoco muy notable, hasta llegar a este valor partiendo de una concentración de 0'1 % de pectina.

La cinética que sigue la formación de este enzima hemos intentado seguirla durante 72 horas de cultivo de E. carotovora en el medio CG y el resultado obtenido aparece en la figura nº 17. Como en todos los ensayos practicados hasta ahora, son los datos que proporciona la lectura a 548 mu los mas bajos respecto a los que

matoso formado por células íntimamente apretadas y de gran resistencia que contribuyen a dar a la planta el aspecto de dureza y estabilidad que podemos observar en la figura nº 19. Estas plantas de col fueron infectadas artificialmente y de una manera periódica con E. carotovora sin que pudiéramos observar ningún síntoma de ablandamiento en la zona de inoculación ni en las proximidades a ella. Cuando el tratamiento fue mas enérgico y practicamos en el tallo una hendidura profunda para facilitar la penetración de la bacteria, la planta permanecia resistente e incluso observamos cómo evolucionaba un proceso de cicatrización en la herida producida, que llegó a mostrar el aspecto que hemos querido resaltar en el recuadro de la figura nº 19. Durante todo el tiempo de observación no se notó ningún síntoma que pudiera revelar daño alguno por la bacteria, ya que la planta mantuvo en todo momento un aspecto sano y completamente normal.

Este comportamiento de la planta de col, nos decidió a seleccionarle como material de estudio a fin de comparar sus caracteres con los de otras plantas de respuesta diferente.

2: Entre las otras plantas estudiadas figura la judía (*Phaseolus vulgaris*), que a diferencia de la col manifestó una clara sensibilidad a la acción patógena de la bacteria E. carotovora. La figura nº 20 muestra la histología de un tallo, que alcanza hasta la zona medular, pudiendo apreciarse además con gran claridad todo su sistema conductor e incluso las células epidérmicas.

La inoculación del tallo de una planta joven, como la que aparece en la figura nº 21, no ofrece ninguna dificultad, y tampoco la inoculación de sus hojas a través del nervio medio. En la misma maceta puede observarse la planta sin tratar, que mantenemos como control, y otra a las 24 horas de inoculada con una suspensión acuosa de E. carotovora. Bastan 18 horas después de la inoculación, para que aparezcan en el punto de penetración una pérdida de dureza fácilmente apreciable al tacto, que va avanzando hasta dominar una zona lo suficientemente amplia, para ser incapaz de sostener el fragmento de tallo que descansa en ella, el cual con

su peso vence la escasa resistencia del área dañada obligándola a plegarse y haciendo que la planta ofrezca el aspecto de la figura que presentamos, donde junto al tallo completamente doblado, puede verse las hojas marchitas y muertas y el aspecto general de destrucción y aniquilamiento del vegetal.

- 3: Muy característico por la sintomatología que presenta es el caso de plantas de haba cuando son víctimas del ataque de E. carotovora. Por su especial constitución el tallo de haba se presenta como un tubo continuo que permite circular libremente por su oquedad a cualquier factor que introducimos por inoculación. Tal vez este desplazamiento rápido justifique las pocas horas transcurridas, desde el momento en que la bacteria establece contacto con la planta hasta que ésta aparece absolutamente destruida. La figura nº 22 presenta varias plantas de haba, de las cuales unas han sido inoculadas y otras se han respetado como control de la experiencia. La inoculación, con la suspensión

bacteriana, se practica en la parte superior del tallo, pero los síntomas se extienden tan rápidamente a lo largo de todo él, que pronto llegan a invadirlo en su totalidad. El ablandamiento que sigue a la inoculación va acompañado de una intensa necrosis que revela ostensiblemente la evolución de todo el proceso de infección en este vegetal. Los síntomas son por tanto incluso mas rápidos que los observados en plantas de judía y además el ennegrecimiento marcadísimo que aparece es un valioso indicador que nos permite seguir facilmente toda evolución de la enfermedad.

También hemos preparado cortes de los tallos de haba, no solo de la planta sana, sino especialmente de la enferma. Su histología típica corresponde a la figura nº 23 que ha sido obtenida por tinción con Rojo de Rutenio y que presenta con claridad todas las zonas del tallo sano. Después de inocular puede verse la destrucción celular que presenta la figura nº 24 con una zona en que la bacteria ha degradado la pared celular, ha utilizado el material que la célula vegetal le

ofrece, y en consecuencia ha provocado la muerte y desaparición de las células atacadas, dando lugar a la formación de una zona hueca que va ensanchándose a medida que la enfermedad avanza hasta llegar a consumir toda la región de parenquima que circunda al sistema conductor con lo que finalmente el aspecto del tallo destruido ofrece el pobre aspecto que muestra la figura nº 25, última recogida de toda esta secuencia.

Las consideraciones apuntadas hasta ahora, nos han decidido a seleccionar los tres tipos de plantas que hemos descrito, para llevar a cabo nuestro estudio y a tal fin con cada una de ellas hemos efectuado una serie de análisis que pudieran revelar algún dato capaz de justificar un comportamiento tan diferente en respuesta a una misma infección, es decir, a la infección que decide la bacteria E. carotovora.

b) Determinación de compuestos químicos

Con el fin de hacer mas facil las comparaciones entre las muestras utilizadas hemos creido conveniente exponer de manera simultánea los datos procedentes de cada tipo de ensayo efectuado. Cuando se trata de plantas susceptibles a Erwinia carotovora exponemos los resultados obtenidos a partir de muestras tanto de planta sana como de planta enferma.

- 1: Siguiendo este criterio indicamos a continuación el contenido en Nitrógeno total, según el método de Kjendahl, que es como aparece en el cuadro nº 2.

Cuadro nº 2

Contenido en Nitrógeno de distintos tejidos vegetales (referido a peso fresco)

Planta	% Nitrógeno
Haba sana	0'205
Haba enferma	0'446
Judía sana	0'1538
Judía enferma	0'584
Col	0'083



2: La diferente función que desempeña en la fisiología vegetal los distintos compuestos nitrogenados es la principal razón para determinar, además de los últimos datos aportados, la proporción de material protéico que integra el tejido de cada una de las plantas objeto de este estudio. El cuadro nº 3 presenta las cifras que corresponden al material utilizado.

Cuadro nº 3

Resultado del análisis protéico efectuado en
diferentes plantas

Planta	Proteína (mg/g peso fresco)
Haba sana	0'802
Haba enferma	2'647
Judía sana	0'739
Judía enferma	4'144
Col	0'964

3: El conocimiento completo de los componentes nitrogenados del vegetal nos lleva a estudiar la naturaleza de aquellos aminoácidos libres que pueden revelarse por métodos cromatográficos. Para mayor claridad en la exposición trataremos aisladamente los resultados obtenidos en cada una de las plantas que utilizamos.

En primer lugar vamos a considerar los aminoácidos libres existentes en el tejido de col, que son los que se indican en la figura nº 26, es decir, arginina, asparragina, glutamina, treonina, ácido glutámico, alanina, prolina, valina y leucina.

La identificación de algunos de estos aminoácidos no ha sido fácil, habiéndonos obligado a recurrir a reveladores específicos con el fin de aclarar resultados dudosos. Así por ejemplo, se ha empleado isatina al 0'2 % para decidir la presencia de prolina, que no se manifiesta claramente con el revelador N-CN, y de

esta forma se ha visto según la figura nº 27 que dicho aminoácido se encuentra en abundancia entre los componentes de la col.

También para decidir la presencia de serina y treonina tuvimos que recurrir a un revelador específico, el de Nessler, que detectó perfectamente la treonina, en forma de una mancha amarilla muy inestable.

Otro grupo de aminoácidos que deseábamos investigar en la col, lo formaban cistina y cisteina para lo que empleamos como revelador especial el CNNa, que nos permitió decidir la ausencia de ambos en el extracto obtenido de la planta de col.

Decididas todas las dudas por las técnicas indicadas, admitimos como aminoácidos de la col los que hemos señalado anteriormente.

4: Después de la col pasamos a considerar el haba, si bien en este caso el análisis es realizado no solo en planta sana sino también en la enferma.

Empleando como revelador N-CN se puede distinguir de acuerdo al cromatograma que presenta la figura nº 28, los aminoácidos siguientes en el tejido sano de haba: lisina, arginina, asparragina, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, ácido amino butírico en muy escasa cantidad, tirosina, valina, triptófano, fenil-alanina y leucina.

La prueba realizada empleando como revelador isatina para poner de manifiesto la presencia de prolina dio resultado negativo, del mismo modo que la realizada usando el revelador de CNNa para la identificación de cistina y cisteina.

En cambio con el reactivo de Nessler se confirma la presencia de serina, aminoácido que ya habíamos reconocido en el cromatograma revelado con N-CN.

Para hacer mas facil la comparación entre aminocácidos del tejido sano y enfermo, rescontamos en un mismo cromatograma el análisis de ambos (figura nº 29). Ante él podemos señalar que la planta de haba al enfermar experimenta pérdida cuantitativa en algunos aminoácidos como son lisina, ácido glutámico, glicina y tirosina; otros por el contrario desaparecen totalmente, tal ocurre con arginina, serina y ácido amino-butírico. También aparecen otros nuevos aminoácidos que no están presentes en la planta sana, como es el caso de ácido aspártico facilmente identificado con el revelador N-CN por el color azul característico que a los pocos momentos vira a un tono púrpura intenso. Y finalmente podemos señalar un aumento cuantitativo en asparragina y valina como consecuencia de la enfermedad.

5: Completando el estudio de aminoácidos pasamos a considerar los resultados obtenidos en judía, que por ser también otra planta sensible a E. carotovora, tendremos que analizarla en muestras procedentes de judía sana y también en las obtenidas de planta enferma.

En nuestro intento de facilitar el estudio comparativo de las tres plantas en las que basamos este trabajo, presentamos en un mismo cromatograma (figura nº 30) el resultado del análisis de aminoácidos obtenido de sus tejidos sanos. En consecuencia podemos señalar como componentes de planta normal de judía a los siguientes: asparragina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, valina y leucina.

Al mismo tiempo es fácil establecer algunas diferencias entre los vegetales estudiados. Así, vemos que prolina y treonina solo aparecen en la planta de col, serina y fenil-alanina en el haba y ácido aspártico tan solo en judía. De todas es el haba la planta que contiene mayor número de aminoácidos.

Cuando la judia enferma, su análisis nos revela mayor cantidad de aminoácidos que en la planta sana. Podemos distinguir en la figura nº 31 el aumento cuantitativo en ácido glutámico, alanina y valina, así como la aparición en el tejido enfermo de histidina, arginina, glicina y treonina que no hemos observado en el sano.

En el cuadro nº 4 presentamos un resumen, donde se pueden apreciar las semejanzas y diferencias que revela el análisis de aminoácidos en plantas sana y enferma de haba, judia y col. En él se recogen todos los datos que ya hemos expuesto.

Cuadro nº 4

Aminoácidos presentes en las diferentes plantas estudiadas

Aminoácidos	Haba S	Haba E	Judía S	Judía E	Col S
Histidina	-	-	-	+	-
Lisina	++	+	-	-	-
Arginina	+	-	-	+	+
Asparagina	+	++	+	+	+
Glutamina	-	-	+	+	+
Serina	+	-	-	-	-
Treonina	-	-	-	-	+
Ac. aspártico	-	+	+	+	-
Ac. glutámico	++	+	+	++	+
Glicina	++	+	-	+	-
Alanina	+	+	+	++	+
Prolina	-	-	-	-	+
Ac. amino-butírico	+	-	-	-	+
Tirosina	++	+	-	+	-
Valina	+	++	+	++	+
Triptófano	+	+	-	-	-
F-alanina	+	+	-	-	-
Leucina	+	+	+	+	+

6: Sustancias reductoras

En este apartado consideramos otro grupo de componentes vegetales que juegan un papel fundamental en la fisiología de la planta.

Los resultados expresados como mg. de glucosa por gramo de tejido fresco, aparecen en el cuadro nº 5 indicando una pérdida, mas o menos marcada, paralela al curso de la enfermedad que sufre la planta,

Cuadro nº 5

Variación en sustancias reductoras
determinadas en diferentes plantas

Planta	mg.glucosa/g.(p.fresco)
Haba sana	5'52
Haba enferma	1'69
Judía sana	1'212
Judía enferma	1'157
Col	2'13

7: Para completar el estudio de los hidratos de carbono en el vegetal, hemos efectuado el análisis cromatográfico de sus azúcares libres, dada la relación que manifiestan con el metabolismo de las bacterias fitopatógenas.

Por la figura nº 32, se observa que el tejido de una planta de haba sana muestra cuatro azúcares diferentes que han sido identificados como sacarosa, glucosa, levulosa y xilosa. Pero si esta misma planta enferma, los cuatro componentes desaparecen y la técnica cromatográfica no revela su presencia en un volumen de muestra que corresponde a 800 mg. de tejido vegetal. En la misma figura puede observarse la ausencia de las sustancias que consideramos, en la planta de haba enferma.

Con el fin de confirmar el número y además la naturaleza de los azúcares que hemos admitido se presentan en el haba sana, decidimos recurrir al naftorre-sorcinol como revelador, con lo que la identificación

es mas exacta, debido a la coloración específica que caracteriza a cada azucar. El resultado corresponde a la figura nº 33 y prueba no solamente la presencia de sacarosa, glucosa, levulosa y xilosa en la planta sana, sino también su pérdida al enfermar por inoculación con E. carotovora.

- 8: Cuando se trata de judia se ha podido ver, también por cromatografía, la existencia de cuatro azúcares identificados como lactosa, sacarosa, glucosa y levulosa, e igualmente se observa que todos ellos, con excepción de una pequeña cantidad de sacarosa, desaparecen al enfermar la planta (figura nº 34) a semejanza con lo ya notado en el caso de haba.
- 9: El estudio de la planta de col conduce a resultados análogos a los señalados para judía, también aquí aparecen lactosa, sacarosa, glucosa y levulosa diferenciándose ambas de la planta de haba en que poseen lactosa y no xilosa como hemos visto contiene el haba sana. En la figura nº 35 puede compararse la composición de las tres plantas cuando están completamente sanas.

10: Sustancias pécticas

Las sustancias pécticas tienen un interés especial en el presente estudio por su intervención definitiva en la defensa de la planta por una parte y en la patogeneidad de la bacteria, por otra.

Pese a las dificultades de su determinación, hemos podido obtener valores muy precisos y reproducibles en diversas experiencias, que son los expuestos en el cuadro nº 6.

Como dato a resaltar debemos señalar que es la judía, la planta que contiene mayor cantidad de sustancias pécticas, seguida de la col, y por el contrario al haba corresponden los valores mas bajos. No obstante e independientemente de la diferente riqueza en cada planta, se manifiesta una caída muy marcada en la proporción de este material como consecuencia de la enfermedad que decide la bacteria E. carotovora.

Cuadro nº 6

Material péctico presente en diferentes plantas (se expresa en mg. de ac. monogalacturónico o por gr. de peso fresco)

Planta	Sustancias pécticas (mg/gr)
Haba sana	0'51
Haba enferma	0'00
Judía sana	1'78
Judía enferma	0'08
Col	1'07

11: Compuestos fenólicos

A las sustancias de naturaleza fenólica se les concede un interés particular dada su especial intervención en la aparición de lesiones que denotan el progreso de la enfermedad en el vegetal.

El análisis de este tipo de material se ha efectuado por cromatografía, recurriéndose a distintas técnicas para diferenciar los resultados del ensayo.

La observación directa bajo luz diurna y luz ultravioleta no reveló compuestos fenólicos en las plantas de judía y col, en tanto que el extracto procedente de haba manifestaba respectivamente, dos y tres antocianos diferentes. Cuando los resultados se observan después de someter el cromatograma a vapores de amoníaco, el número de derivados fenólicos en el haba aumenta hasta cinco, manteniéndose ausentes en las muestras procedentes de judía y col. Ello nos sugiere que en el haba existen compuestos de tipo antociano y flavonoide

que no aparecen en los tejidos de plantas de col y judía que se sometieron al mismo tratamiento de extracción.

Además de la técnica que señalamos, hemos empleado también el revelado de los cromatogramas con p-nitroanilina, vainillina clorhídrica y Cl_3Fe . En los dos primeros casos los resultados fueron negativos para todo el material utilizado, en cambio el cloruro férrico nos proporciona los datos que aparecen en la figura nº 36, por la que podemos concluir que de las tres plantas utilizadas tan solo existen derivados fenólicos en el haba que pueden ser incluidos dentro del grupo de antocianos y de flavonoles.

Que durante el proceso de la enfermedad se modifica el metabolismo de estos compuestos, es un hecho claro que se revela en la prueba que aporta la figura nº 37. En ella se analiza la planta de haba sana junto a plantas enfermas en dos fases distintas de evolución: la primera cuando aparecen las lesiones con las que se inicia la enfermedad y la segunda en el momento en que toda la planta ha sido dominada por la infección

bacteriana. No hay duda, por tanto, de que los derivados fenólicos intervienen, y sufren alteraciones que conducen a su desaparición, durante la degeneración del tejido vegetal que determina E. carotovora en su acción destructora sobre la planta de haba.

12: Grado de humedad

Puesto que el grado de humedad del tejido puede ser un factor que facilite o impida el normal desarrollo de la bacteria patógena, hemos llevado a cabo su determinación a 80° C., con el fin de considerar hasta que punto influye en la posible enfermedad que causa Erwinia carotovora. Los resultados aparecen en el cuadro nº 7.

Cuadro nº 7

Contenido de humedad en distintas
plantas sanas y enfermas

Planta	% Humedad (gr.)
Haba sana	88'796
Haba enferma	77'18
Judía sana	70'57
Judía enferma	66'7
Col	92'86

13: Valores de pH

La profunda alteración que experimentan los componentes de la célula vegetal a medida que avanza la enfermedad, que acabará por dominar a la planta, se va reflejando en los cambios de pH que observamos y que hemos expuesto en el cuadro nº 8, donde también señalamos los valores normales que corresponden a las diferentes plantas estudiadas.

Cuadro nº 8

Determinación de pH en distintos tejidos vegetales sanos y enfermos.

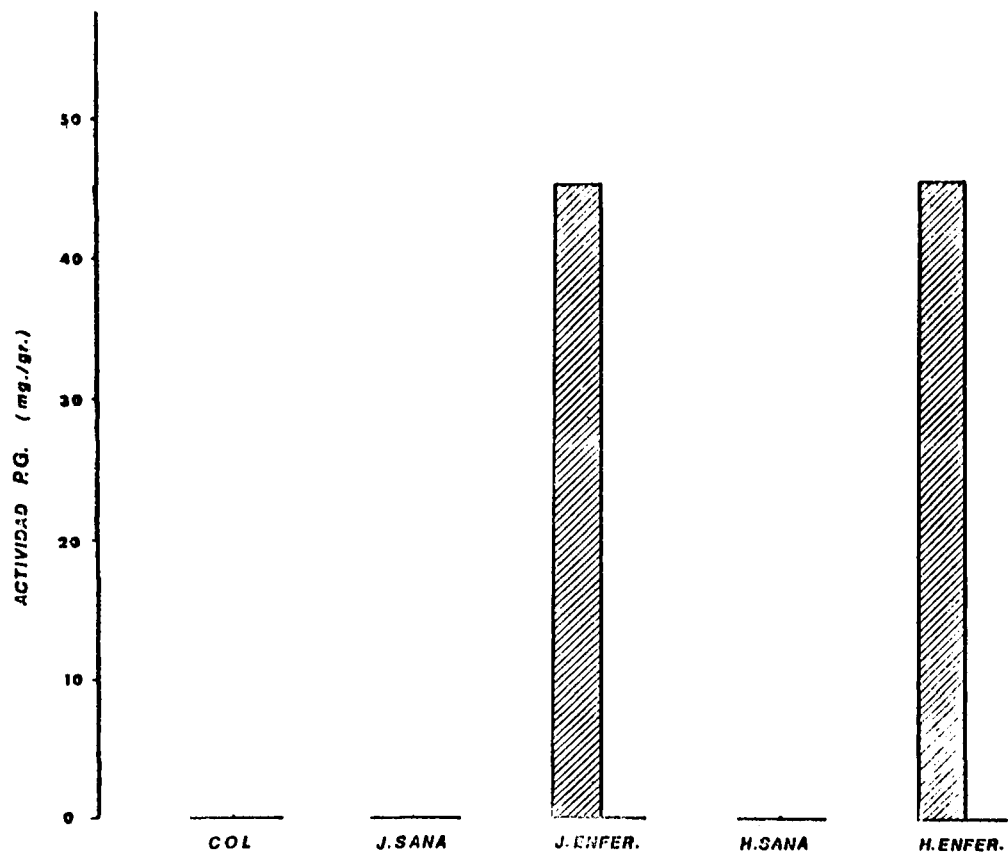
Planta	pH
Haba sana	5'4
Haba enferma	7'2
Judía sana	5'8
Judía enferma	6'4
Col	6'0

c) Determinación de enzimas vegetales

Son varios los factores enzimáticos responsables del desarrollo de todo vegetal, y de acuerdo a cada uno de sus periodos de evolución puede señalarse un determinado grupo de enzimas sin cuya intervención se detendría la fase fisiológica correspondiente. Por ello hemos querido conocer la presencia, en las plantas que estudiamos, de dos tipos fundamentales de enzimas, pectolasas y fenolasas, que son además las que pueden interferir en el complejo mecanismo que decide el estado normal o de enfermedad de una planta.

1: Presencia de PG

La variación en los valores de pH, que hemos observado en uno de los apartados anteriores, nos ha decidido a estudiar la actividad PG de distintos tejidos vegetales, a dos pH diferentes que corresponden a la zona ácida y alcalina. Los resultados se encuentran recogidos en la figura nº 38.



- 130 -

Fig. nº 38.- Presencia del enzima PG en las plantas estudiadas, sanas y enfermas. La determinación se hace a pH 5'5 () y a pH 9'3 ().

2: Presencia de PE

También en este caso se valora el enzima a dos pH distintos, tanto en las plantas sanas, como en las que han enfermado, y a diferencia de los datos correspondientes al enzima PG, que acabamos de considerar, en este caso la actividad se presenta en la zona de pH ácido siendo además manifiesta tanto en plantas resistentes como susceptibles, y en sanas como en enfermas. Los valores que corresponden a esta determinación aparecen en la figura nº 39.

3: Presencia de PATE

Seguimos la técnica adoptada para su determinación, de realizar la lectura espectrofotométrica a dos longitudes de onda, 230 y 548 mu. Exponemos a continuación los valores resultantes, que vienen a confirmar el incremento de este enzima en las plantas enfermas, así como su mayor concentración en los tejidos susceptibles que en los resistentes a la enfermedad producida por E. carotovora. Todo ello queda expresado en la figura nº 40.

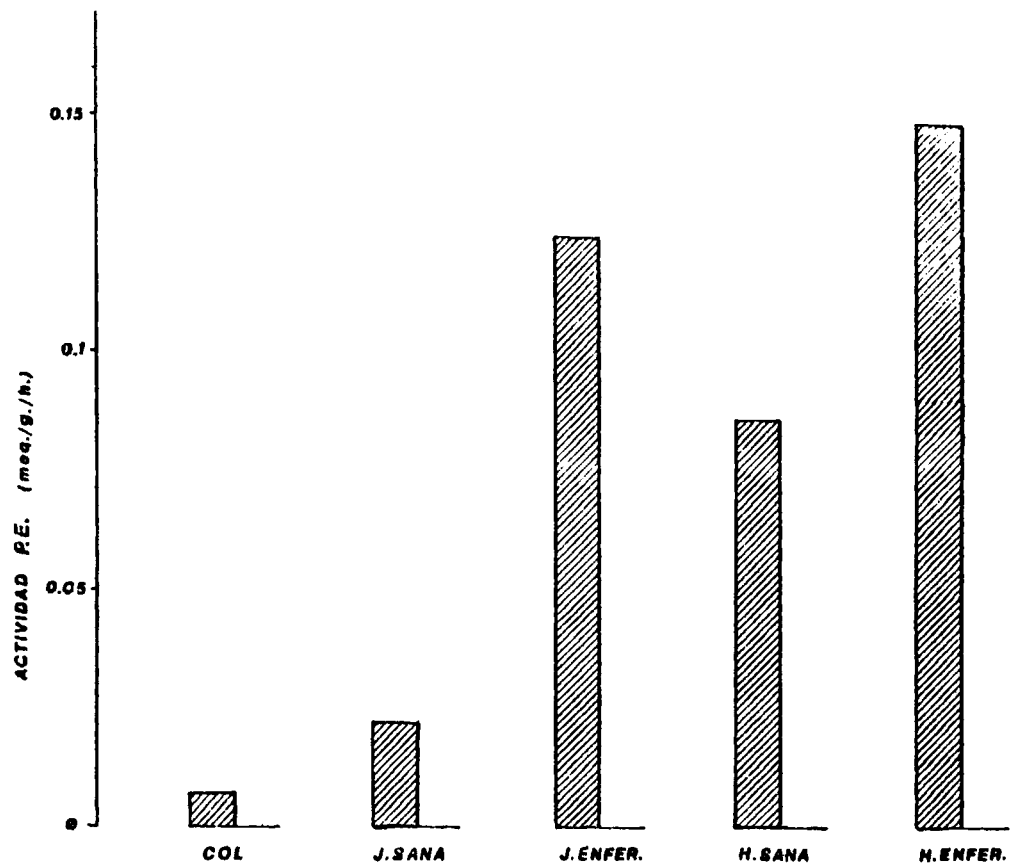


Fig. nº 39.- Actividad PE en los tejidos de las plantas estudiadas, sanas y enfermas, a pH 5'5 () y a pH 9'3 ().

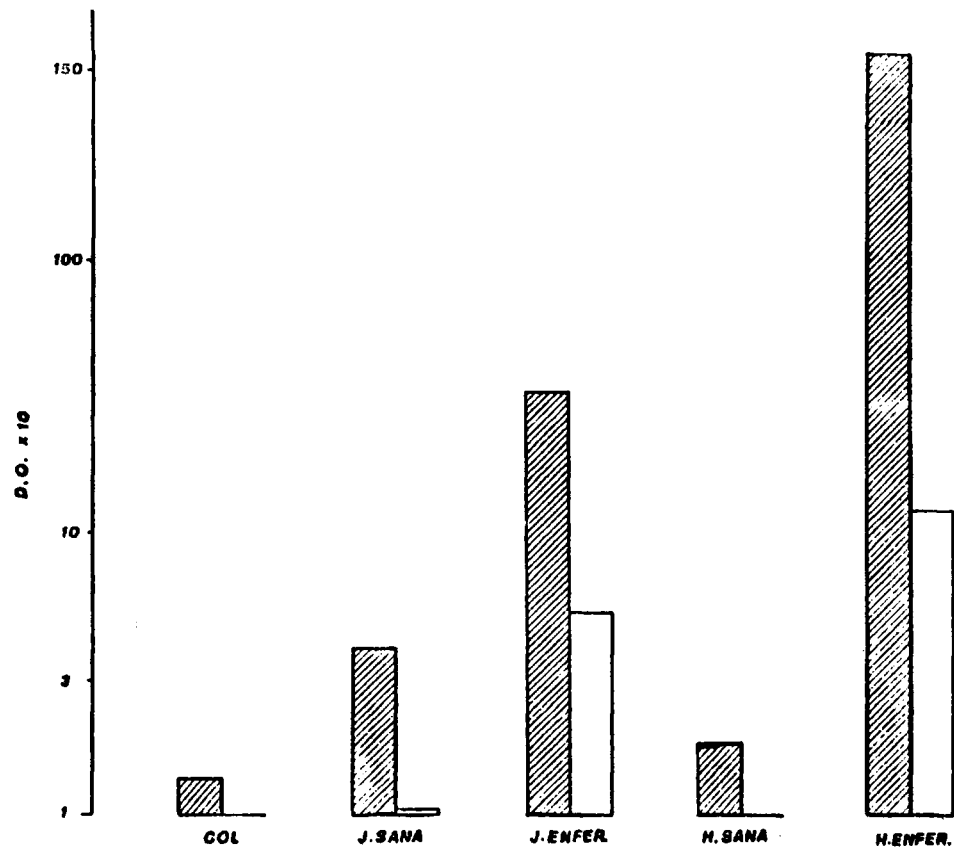


Fig. nº 40.- Actividad PATE presente en los tejidos de las plantas estudiadas, sanas y enfermas. Se determina a 230 mu () y a 548 mu ().

4: Presencia de PTE

A pesar de la semejanza en cuanto al mecanismo de acción, que relaciona a este enzima con el PATE, que acabamos de considerar, no existe paralelismo en cuanto a su presencia en los tejidos vegetales que consideramos. Por la figura nº 41 puede deducirse no solo la mayor precisión de la determinación a 235 mu, sino también la ausencia de PTE en plantas sensibles a E. carotovora y su aparición en estas mismas plantas cuando enferman, así como en los tejidos de col que sabemos es resistente a la acción patógena de E. carotovora.

5: Presencia de fenolasas

La determinación de este tipo de enzimas ha dado resultados negativos tanto en plantas de col como de judía, no solo sana sino enferma. En cambio hemos observado su presencia en los extractos obtenidos a partir de plantas de haba, apreciándose además, cómo va aumentando a medida que aumentan y se generalizan las lesiones que presenta la planta después de ser infectada con E. carotovora. En la figura nº 42 expresamos la actividad de fenolasa en tejido sano así como en la fase media y final de la enfermedad que acaba destruyendo totalmente a la planta.

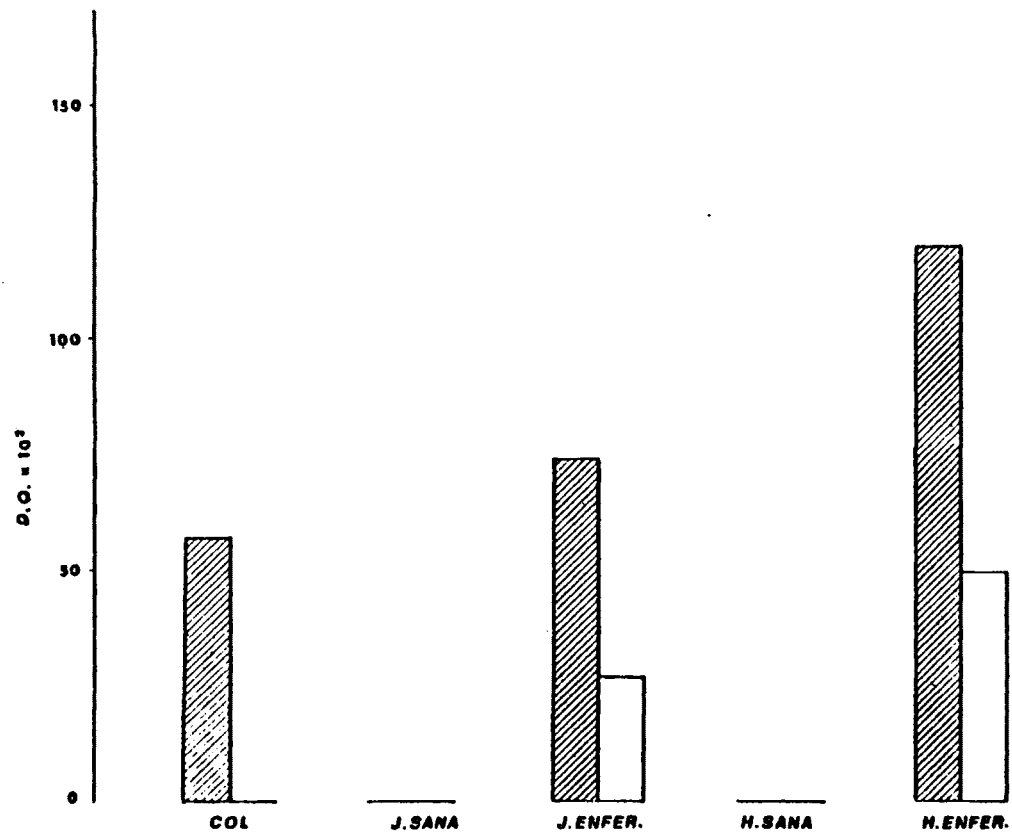


Fig. nº 41.- Actividad PTE encontrada en las distintas plantas estudiadas, sanas y enfermas. Se determina a 235 mu () y a 548 mu ().

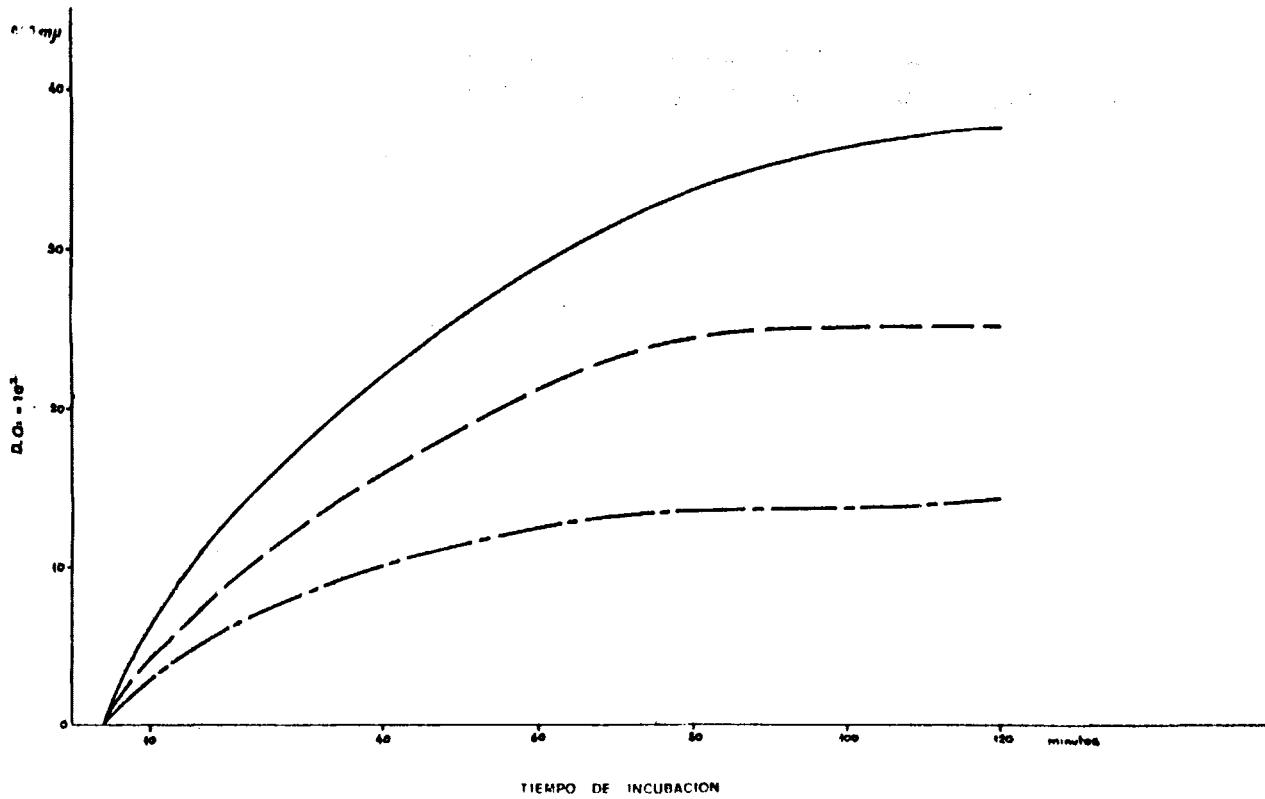


Fig. nº 42.- Fenolasa presente en planta de haba sana(), así como en las fases inicial () y final () de su enfermedad producida por E. carotivora.

IV. DISCUSSION

WOOD, (134), y STAKMAN (107), entre otros, han realizado un estudio de gran interés sobre las consecuencias que las enfermedades vegetales pueden ocasionar en la humanidad, no ya por la pérdida económica que ellas suponen, sino principalmente por la disminución de disponibilidades alimenticias para la población animal.

Desde que en 1883 BURRIL(14) en Illinois y WAKER (127) en Amsterdam demostraron que las bacterias podían causar enfermedades en plantas, se ha venido estudiando incesantemente el papel de estos microorganismos en las enfermedades vegetales, intentando con ello igualar en conocimientos a cuanto es sabido acerca de fitoinfecciones por hongos, problema éste último que fue aceptado 200 años antes de que se admitiese la existencia de bacterias fitopatógenas.

El denominar fitopatógena a una bacteria supone que es capaz de dañar a tejidos vegetales, de los que obtiene las sustancias necesarias para su desarrollo y reproducción. Con ello el patógeno pasa a ser a su vez, parásito de la planta huésped que ha sido atacada.

La importancia que en este proceso se atribuye a los enzimas bacterianos ha sido señalada por STAPP (110) y también por JONES (58) quien demostró que el enzima del microorganismo patógeno se difunde con tal rapidez que es realmente el agente que facilita su propagación.

En el presente trabajo hemos estudiado los tipos de enzimas que la bacteria Erwinia carotovora produce y la acción de los mismos sobre los componentes de la célula vegetal, y por otra parte consideramos también el material que integra el tejido de planta de col, judía y haba, lo que nos ha permitido establecer cuales son los factores principales, tanto de origen bacteriano como vegetal, que intervienen de forma mas decisiva en la manifestación del caracter fitopatógeno de la bacteria o del grado de defensa de la planta.

La primera consideración de interés se refiere al hecho de que E. carotovora es una de las pocas bacterias capaz de desarrollarse en un medio que contiene como única fuente de carbono compuestos de naturaleza péctica, cualidad que debemos destacar por tratarse de una bacteria fitopatógena que por tanto, puede metabolizar los derivados pécticos que integran el material vegetal.

No obstante, esta circunstancia no basta para justificar el desarrollo de la enfermedad que produce en tejidos de origen vegetal, puesto que según vemos plantas resistentes como es Brassica oleracea no son invadidas por Erwinia carotovora a pesar de contener una riqueza péctica superior, en ocasiones a otras plantas notablemente sensibles, como es Vicia faba, que conteniendo el 50 % del material péctico presente en aquella, llega a ser dominada fácilmente por E. carotovora. Por otra parte vemos así mismo que vegetales como judía que poseen mayor riqueza péctica que la detectada en tejidos resistentes, puede llegar a enfermar fácilmente. No es por tanto la concentración péctica el factor decisivo para el avance bacteriano, aunque juegue un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

Esta deducción nos lleva a considerar las condiciones que permiten o dificultan la actuación de aquellos otros factores responsables mas directos del proceso fitopatológico, entre los que se encuentran los enzimas.

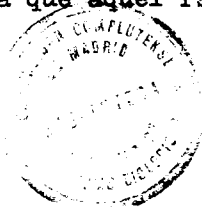
La síntesis de enzimas pectolíticos por la bacteria E. carotovora representa indudablemente una razón poderosa para la colonización del huésped, pero que no puede ser admitida como la clave de su patogeneidad, ya que estos enzimas además de ser producidos, deben encontrarse en un medio en el que sea posible su actividad, puesto que a ella se debe en definitiva el avance de la infección en el vegetal.

Entre todos los enzimas estudiados vamos a considerar en primer término uno de los primeros conocidos, poligalacturonasa (PG). Se trata indudablemente de un enzima inducible porque, según hemos comprobado no aparece en los medios en que E. carotovora no dispone de sustancias pécticas, y que además puede experimentar un proceso de represión por acción de diferentes compuestos azucarados. Este caracter no se puede generalizar a los enzimas

de todos los microorganismos fitopatógenos por conocerse algunos estudios que confirman lo contrario. Así SPALDING y col. (106) hallan que PG es enzima de constitución en el Cephalosporium gramineum, y también DEMAIN y PHAFF (22) lo sostienen en el caso de Saccharomyces fragiles.

Nuestra afirmación tiene interés por poder desechar la acción de PG en aquellas ocasiones en que su síntesis no sea posible, bien por no existir agente inductor o bien por estar presente algún factor de acción regresiva.

Los resultados que presentamos, indicando la velocidad de síntesis PG en diferentes medios pueden así mismo, justificar el resultado de la interacción de E. carotovora con su huésped, ya que puede ocurrir que éste ejerza una defensa activa tan rápida que consiga rechazar la infección, como ocurre de hecho en el caso de la patata que impide su destrucción por Pseudomonas syringae, dada la lentitud de dicho microorganismo para sintetizar enzimas pectolíticos, en tanto que este mismo vegetal es destruido fácilmente por Erwinia aroidea que sintetiza los enzimas pectolíticos casi tres veces mas deprisa que aquel Pseudomonas.



Tiene por consiguiente gran importancia el saber cómo E. carotovora sintetiza PG, que es según hemos visto durante su fase logarítmica de crecimiento, manteniéndose de forma constante estos valores a lo largo de la fase estacionaria de la bacteria. Podemos decir por lo tanto, que se trata de un enzima que puede actuar durante un periodo muy largo de la vida de E. carotovora, lo que sin duda ha de tener importancia por facilitar la infección bacteriana durante un espacio que puede ser tan amplio como eficaz.

De las distintas técnicas que hemos ensayado para valcrar la actividad PG, ha sido la de JANSEN y Mc. DONNELL (55) la adoptada para nuestro estudio por creer que sus datos tienen un sentido mas amplio que las pruebas de viscosidad o las de difusión en placa, por reflejar estas últimas con mas precisión la hidrólisis en posiciones centrales que en las extremas, de la molécula péctica.

Relacionado con PG aparece otro enzima que cataliza la hidrólisis metilester en pectina con eliminación de metanol, es la llamada pectinesterasa ó PE. tam-

bién PE puede ser sintetizada por E. carotovora y también hemos estudiado su síntesis en relación con el desarrollo de la bacteria. Ocurre en este caso que su formación es muy lenta y que precisa cuatro veces mas tiempo que PG para alcanzar su máximo. En muy pequeña cantidad puede detectarse en la fase logarítmica y su aumento aunque continuo transcurre a tan escasa velocidad que su éxito en el proceso de fitoinfección se debe principalmente a su acción simultánea con otros muchos factores de diversa índole: física, química, enzimática, etc. etc. Este enzima necesita también de iones Na^+ , dato que juega un papel bien significativo cuando actua a nivel de célula vegetal y además muestra una inhibición por exceso de sustrato que se acentúa hasta llegar a representar el 35 % para una concentración doble de la que proporciona una actividad máxima.

Los dos enzimas hasta ahora considerados, PG y PE, se han venido relacionando con enfermedades de plantas producidas por muy variados microorganismos, pero la influencia extraordinaria que en su síntesis ejerce el medio de cultivo ha hecho muy confuso el estudio de su

formación. Por ello existen ciertas discrepancias para atribuir o no la síntesis de ellas a E. carotovora. Según DAVISON y WILLAMAN (19) dicha bacteria sintetiza PG pero no PE. Para KRAGHT y STARR (66) E. carotovora forma no solo un PG sino también PE, lo que deduce de la producción de metanol en el medio con pectina donde la bacteria se desarrolla; en cambio WALTON y CAPPELLINI (131) no descubren síntesis de PE y sí de otros enzimas petolíticos.

El hecho de que nosotros hayamos probado la formación por E. carotovora de los dos enzimas considerados nos permitirá mas adelante juzgar su intervención en el proceso de la enfermedad de la planta atacada, donde también interviene otro tipo de enzimas, estudiados igualmente en E. carotovora, que son pectintranseliminasa (PTE) y ácido péctico transeliminasa (PATE).

Pasando a considerar PTE, la primera observación a destacar es el pH alcalino al que actúa, por lo que su intervención alterando la fisiología vegetal ha de ir acompañada de ciertos cambios metabólicos que favorezcan la manifestación de las condiciones necesarias para su actividad.

Otra nota de interés se refiere al método que seguimos para valorar PTE, que utiliza la lectura en espectrofotómetro a dos longitudes de onda diferentes. Así, hemos podido comprobar que la determinación a 235 mu da valores mucho mas elevados que la realizada a 548 mu y además dentro de una zona donde el error de lectura es menos frecuente, y si a esto se añade que la valoración a 548 mu es mas larga y costosa, se comprenderá facilmente que nos inclinemos a utilizar para medir la actividad PTE el camino mas corto, y que admitimos también mas exacto, de leer directamente a 235 mu.

Otro hecho interesante respecto a este enzima lo constituye el haber sido estudiado en E. carotovora cultivada en dos medios de cultivo diferentes. Por los datos que presentamos puede deducirse que pese a la distinta composición de ambos, el comportamiento del enzima en todos los ensayos efectuados es muy paralelo, es decir, que no se manifiestan cambios cualitativos o cuantitativos que se puedan atribuir a los elementos que integran los medios donde E. carotovora sintetiza PTE.

Parte de lo que acabamos de exponer respecto al enzima pectintranseliminasa puede hacerse extensivo al PATE. El pH al que actúa es también alcalino, e igualmente la técnica de valoración es mas sensible y exacta cuando las lecturas se efectúan a 230 mu; al pasar a la zona de 548 mu los valores caen y la precisión también, por lo que estimamos el prescindir de la prueba del ATB.

Una diferencia entre PTE y PATE lo constituye el estudio de este último enzima cuando es sintetizado en dos medios diferentes por el mismo microorganismo. Hemos podido comprobar que la producción por E. carotovora de PATE en el medio CG ofrece valores que son inferiores a un tercio de los obtenidos cuando el cultivo tiene lugar en el medio S. Esta diferencia si bien se acusa en las lecturas realizadas a 548 mu es mas precisa cuando se examinan los datos obtenidos a 230 mu. De cualquier forma es una observación interesante que tiene algunos precedentes señalados por diferentes autores. Ya en 1952 AYRES y col. (7) apuntan que las condiciones de cultivo pueden influir en el tipo de enzimas pectolíti-

cas producidas in vitro. También HANCOCK y col. (45) concluyen que las condiciones de cultivo pueden ser el principal factor que determine el tipo de enzima producido.

Existe por lo tanto la probabilidad de que según las circunstancias que concurren en el desarrollo de un microorganismo, éste podrá o no sintetizar determinados enzimas, por lo que siempre que se desee realizar un estudio enzimático es preciso fijar las características del mismo, única forma de prevenir errores por desconocimiento de factores que pueden intervenir de una manera directa y definitiva.

Por ello, y teniendo en cuenta que los enzimas que estudiamos han sido sintetizados por una bacteria fitopatógena, E. carotovora, hemos creído fundamental realizar un estudio de las características que concurren en determinados tejidos vegetales, para deducir del mismo el comportamiento de aquella bacteria cuando las mas diversas circunstancias hacen que establezca contacto con los tejidos estudiados.

La primera observación, fundamental por llegar a decidir si E. carotovora invade y destruye un vegetal, es la presencia en éste de alguna lesión que permita el acceso de la bacteria; pero en el supuesto de que se dé esta circunstancia puede suceder que no aparezca ningún síntoma en el vegetal atacado, que revele la llegada de E. carotovora. A este respecto hay que recordar con MARTIN (75) la importancia de las sustancias nutritivas que integran las estructuras celulares del tejido de la planta, por lo que vamos a relacionarlas con la evolución del posible patógeno.

Comenzamos por considerar el contenido en Nitrógeno de las tres plantas estudiadas, es decir, col, judía y haba, ya que algunos autores, entre ellos GASSNER y FRANKE (38) lo han relacionado con la defensa del vegetal a la enfermedad. Así podemos admitir que según nuestros resultados, el Nitrógeno inorgánico tiene valores mas bajos en la planta resistente, mientras que en las sensibles a E. carotovora alcanza cifras dos o tres veces superiores. Una conclusión análoga se debe a van ANDEL (3) que consigue aumentar la susceptibilidad en plantas tratadas con Nitrógeno en forma de sales inorgánicas o de urea.

Si pasamos a considerar el Nitrógeno protéico, nuestros datos no acusan diferencia en las tres plantas que estudiamos, si bien se inclina ligeramente en favor de la col, no obstante los valores son tan próximos que no encontramos fundamento para admitir con GRUMMER (42) que la cantidad de proteína de la planta disminuye con su resistencia a la enfermedad. En cambio hay mas razón para suponer, de acuerdo con RUBIN y ARTSIKHOVSKAYA (93) que a medida que aumenta la relación entre Nitrógeno protéico y no protéico se intensifica el metabolismo asociado con síntesis intensa, que suele caracterizar a plantas resistentes al ataque de parásitos.

En cuanto al comportamiento de las plantas al enfermar, observamos que tanto en haba como en judía aparece un aumento notable no solo en Nitrógeno inorgánico sino también protéico. Un hecho análogo ha sido señalado por PEGG y SEQUEIRA (85) en plantas de tabaco infectadas con Pseudomonas solanacearum, y también por ROHRINGER y SAMBORSKY (92) y por HEITFUSS y col. (50) quienes demostraron por técnicas inmunoquímicas la presencia de tres nuevas proteínas en col infectada por Fusarium oxysporum

f. conglutinans. Junto a estos autores hemos de suponer que el aumento señalado es consecuencia de la síntesis inducida, en los tejidos enfermos, de nuevas proteínas de carácter enzimático.

Las proteínas del vegetal están formadas por los mismos aminoácidos que se han identificado en el resto de los seres vivos, que además pueden encontrarse libres dentro de la propia célula, y en este estado pueden también intervenir facilitando o impidiendo el establecimiento de la enfermedad.

Bajo esta idea hemos realizado el análisis de los aminoácidos libres en col, judía y haba, y como primera consecuencia deducimos que el número de aminoácidos que contiene cada una de las plantas no es dato significativo ya que en judía existen aproximadamente la mitad que en haba y ambas plantas son susceptibles a diferencia de la col que contiene un número de aminoácidos intermedio al de aquellas.

Nosotros vamos a realizar una revisión de los aminoácidos que hemos hallado en las distintas plantas

que estudiamos, para relacionarlos con su caracter resistente o susceptible a la bacteria Erwinia carotovora.

Como dato interesante podemos señalar el contenido de treonina y prolina en tejido de col, aminoácidos que no aparecen en las otras plantas. Si su presencia es o no significativa en la col, no puede decidirse con caracter individual dadas las numerosas interrelaciones que existen. No obstante, podemos suponer la posibilidad de su participación en la manifestación de resistencia de Brassica oleracea, si recordamos los estudios de FELDMAN y HANKS (28) así como los de SING y SMALLEY (100) que señalan la gran cantidad de prolina existente en la savia de olmos resistentes y los de ELGERSMA (27) que también se expresa en este sentido. Por tanto no creemos aventurado admitir que la prolina figure como uno de los aminoácidos que coadyuvan a la defensa del vegetal.

Antes de seguir adelante hemos de recordar la importancia que puede tener no ya la presencia de un aminoácido, sino también su ausencia o incluso el distinto porcentaje en que se encuentre. También es sabido que el

umento, en el contenido de ciertos aminoácidos va acompañado con frecuencia por la disminución de otros y este nuevo equilibrio entre ellos puede llegar a decidir la evolución del microorganismo fitopatógeno y por tanto la invasión del huésped.

Los resultados de nuestras experiencias nos llevan a señalar un grupo de aminoácidos, que por encontrarse tanto en plantas sensibles como resistentes, en sanas como enfermas, pueden ejercer su acción mediante estímulo o bloqueo de otros factores de acción mas decisiva en el proceso de infección vegetal. El grupo a que nos referimos lo forman asparragina, ácido glutámico, alanina, valina y leucina. Por referencias conocidas nos atrevemos a afirmar que los dos primeros ejercen en haba y judía una acción positiva para su ataque por E. carotovora; la asparragina es uno de los componentes mas frecuentes que figuran en medios de cultivo para esta bacteria (104) y el ácido glutámico también es conocido por su acción estimulante en el desarrollo de E. carotovora y en su síntesis de enzimas pectolíticos (117); por tanto no es ex-

traño que puedan señalarse, en los casos que indicamos, ejerciendo una acción favorable, que por el contrario no podemos justificar para la col.

Hemos de hacer notar que el paso de tejido sano a enfermo, por inoculación con E. carotovora, puede suponer un aumento o disminución cualitativo de aminoácidos. Ambas circunstancias las hemos observado respectivamente en plantas de judía y haba. La primera de ellas al enfermar nos presenta nuevos aminoácidos, que no hemos podido ver cuando está sana. Estos aminoácidos son: histidina, arginina, glicina y tirosina. Hemos de recordar que si bien la histidina no tiene aisladamente una acción positiva sobre el metabolismo de E. carotovora, en cambio es capaz de estimular tanto su desarrollo como su síntesis PG, cuando actúa simultáneamente a otros aminoácidos. Por ello no es extraño que aparezca en el tejido de judía enferma.

También la presencia de arginina puede justificarse recordando los estudios de FELDMAN y HANKS (28,29) en raíces y hojas de Pampelmusa de la India, por haber igualmente demostrado el incremento en ellas de arginina a medida que eran invadidas por Radopholus similis.

En cuanto a la tirosina se ha relacionado con procesos infectivos basándose en muy diversos criterios, pues mientras algunos autores como PEGG y SEQUEIRA (85) hacen participar a tirosina y fenil-alanina en la formación de melaninas, otros, entre los que figura RUDOLPH (94), afirman que este aminoácido aparece en hojas de trigo que han sido infectadas con roya. En esta diversidad de criterio indudablemente las plantas de judía que nosotros estudiamos, participan de la respuesta señalada por RUDOLPH.

Los cambios metabólicos que aparecen en las plantas dañadas transcurren de modo muy distinto, no ya para cada tipo de enfermedad sino incluso para las distintas plantas que son atacadas por un mismo microorganismo fitopatógeno. Así lo hemos podido asegurar al contemplar las respuestas de las plantas estudiadas cuando se han inoculado con E. carotovora. Acabamos de señalar el aumento en el número de aminoácidos que aparece en la planta de judía enferma con respecto a la sana, y hemos de señalar también la disminución de estos componentes cuando la planta que enferma es el haba. Uno de los ami-

noácidos que desaparecen en el haba atacada por E. carotovora es arginina, en oposición a lo observado con judía, si bien ha sido confirmado con anterioridad por los estudios de Mc. COMBS y WINSTEAD (17) realizados en pepino que infectan con Pythium aphanidermatum.

La disminución o desaparición de determinados aminoácidos está justificada no solamente por la actividad enzimática de la planta, promovida por la infección, sino también por la utilización directa de la propia bacteria que origina la enfermedad. Como caso interesante deseamos destacar la aparición y aumento respectivamente de ácido aspártico y asparragina en haba, que no creemos se deba exclusivamente al aporte del parásito sino que ha de ser considerado entre las respuestas del vegetal, de manera semejante a lo apuntado por PATEL y WALKER (84) en sus estudios con Pseudomonas phaseolicola.

Ante estas breves consideraciones hemos de reconocer la importancia de las interrelaciones de todos los factores que intervienen en la fisiología del vegetal, por llegar a ser en algunos casos responsables de

la evolución de la enfermedad. Por ello vamos a discutir a continuación la influencia de sustancias reductoras en la defensa vegetal.

De todos los componentes de la planta son los carbohidratos los utilizados con mas avidez por los microorganismos fitopatógenos por lo que desde el primer momento se les relacionó con el desarrollo del proceso de infección vegetal. La variedad de material que se sometió a este tipo de estudios, así como la diversidad de agentes fitopatológicos considerados no podían por menos que conducir a conclusiones bien distintas, y así mientras autores como ATTI (5) y NELSON (82) relacionaron el alto contenido en azúcares del tejido vegetal como un hecho favorable a la infección, otros, entre los que se encuentran WEINHOLD y BOWMAN (132), admiten que el aumento en azúcares supone una protección notable por parte de la planta. Los resultados que nosotros hemos obtenido nos permitirían apoyar indistintamente cualquiera de estas conclusiones ya que pese a la diferente cantidad de sustancias reductoras que aparecen en plantas de haba y judía, ambas han sido facilmente dominadas por E. caroto-

vora, en tanto que la col con un contenido intermedio entre las plantas citadas ofrece una clara resistencia frente a la misma bacteria. Han sido HORSFALL y DIMOND (52) quienes haciendo un estudio exhaustivo sobre este tema han llegado a diferenciar dos tipos de enfermedades vegetales, según cursen en presencia de un bajo nivel de azúcares o por el contrario requieran una elevada concentración de estas sustancias. Teniendo en cuenta este criterio, podríamos justificar la diversa respuesta que hemos obtenido en las plantas estudiadas, si bien, y al igual que aquellos autores, hemos de admitir que este efecto puede o no ser específico. Mas adelante exponemos uno de los posibles mecanismos de acción de las sustancias reductoras sobre la patogeneidad de E. carotovora.

El parasitismo indudablemente supone una interrelación nutritiva, puesto que el patógeno ha de alimentarse de los tejidos del huésped, y siendo las sustancias que estamos considerando de las que mas afectan al desarrollo del parásito, es lógico que vayan desapareciendo a medida que avanzan las lesiones típicas de la enfermedad. Pero esta misma interrelación ha de justifi-

car la diferencia que observamos entre el consumo de sustancias reductoras en la planta de haba enferma y en la de judía, ya que en el primer caso se acusa un descenso de 69 %, que en la judía solo alcanza el 4'5 %. Ante estos datos hemos de pensar que la clasificación de HORSFALL y DIMOND (52) no supone solamente una diferencia en el contenido de sustancias reductoras de la planta, sino que refleja también un distinto comportamiento de E. carotovora que puede manifestar su acción fitopatógena por mecanismos diferentes, en los que participan conjuntamente muy diversos componentes vegetales.

Los datos que hemos obtenido en nuestras experiencias nos permiten señalar que en la planta de haba la bacteria progresa principalmente a expensas de sustancias reductoras si bien también consume los compuestos pécticos que la planta contiene en proporción muy inferior a la judía. Por el contrario cuando E. carotovora ataca la planta de judía apenas utiliza los compuestos de naturaleza reductora, pero en cambio metaboliza rápidamente todas las sustancias pécticas. Para justificar esta distinta preferencia de una misma bacteria, hemos

querido estudiar de forma cualitativa los azúcares libres que existen en los tejidos no solo de plantas de haba y judía sino también de col, planta ésta última que aunque se asemeja a la judía en su composición química muestra por el contrario una marcada resistencia a E. carotovora. Los datos que hemos obtenido por cromatografía señalan la presencia de los mismos azúcares en col y judía, que se diferencian de la planta de haba en que esta última carece de lactosa y contiene en cambio xilosa. Es posible que la xilosa esté asociada a la pectina lo que establecería una nueva característica para diferenciar al haba de los demás vegetales que estudiamos. En cuanto a los otros azúcares es la sacarosa principalmente la relacionada con la susceptibilidad a la enfermedad vegetal, como lo indican RUSSELL (96) y SUBBARAYNDN y WILCOXSON (112) entre otros.

Nosotros realizamos un estudio in vitro de la influencia que ejercían distintos azúcares en la producción celular y enzimática de E. carotovora y pudimos comprobar que glucosa y levulosa muestran una acción estimulante a dosis bajas y al aumentar de concentración, la acción pasa a ser inhibidora de la síntesis de enzimas (118). Puesto que por otra parte (119) sabemos que la

pérdida de actividad enzimática en E. carotovora, va acompañada de desaparición de patogenicidad, hemos de admitir que la presencia de azúcares en el medio en que la bacteria se encuentra puede ser causa de una represión catabólica que justifique la manifestación de resistencia. Esta idea tendría su precedente en los trabajos de GAUMANI y BOHNI (39) y de KEEN y HORTON (61).

Por otra parte hemos de notar que a medida que avanza la enfermedad en plantas de haba y judía, van desapareciendo los azúcares libres hasta llegar a no ser detectados en el tejido enfermo, lo que ha de atribuirse a su fácil asimilación por E. carotovora que acaba por metabolizarlos totalmente. Este hecho no es nada extraño, dadas las exigencias nutritivas de los microorganismos, y ha sido también notado por Mc. COMBS y WINSTEAD (17) en el pepino infectado por Pythium aphanidermatum y por STRECH y CAPPELLINI (111) en sus experiencias con Glomerella cingulata.

Si las plantas de judía y col nos han sorprendido con una cantidad de sustancias pécticas bastante semejante, a diferencia de lo que ocurre en el haba, hemos

de considerar la posibilidad de que exista alguna diferencia en su naturaleza que puede ayudar a justificar su distinto comportamiento con E. carotovora. En primer lugar, la estructura compacta del tejido de col puede ser un obstáculo para el fácil avance de E. carotovora, pero además no sería extraño que el material péctico de sus paredes celulares esté enmascarado por otros polímeros del tipo de la lignina, causantes de una alteración suficiente para que los enzimas bacterianos al no encontrar su sustrato específico no puedan facilitar la difusión de la bacteria, que quedaría entonces localizada en el punto de penetración siendo incapaz de originar lesión alguna. Este mecanismo de resistencia es uno de los que señalan TURNER y BATEMAN (123).

Además de las diferencias señaladas hasta ahora, en las tres plantas que consideramos, hemos de resaltar por su trascendencia un nuevo aspecto que puede revelar datos de extraordinario interés para comprender el proceso fitopatológico. Nos estamos refiriendo al metabolismo de sustancias de naturaleza fenólica. Los análisis que hemos practicado ponen de manifiesto la presencia de

fenoles en el tejido de haba, sin que hayamos podido comprobar su existencia en las otras plantas. El papel de estos compuestos en órganos vegetales se ha asociado con su resistencia a determinadas enfermedades, como indican SCHAAL y col. (98), KIRKHAM (63), PRIDHAM (87), BATEMAN y MILLAR (10), etc.

Sabemos (116) que los derivados del fenol impiden in vitro el desarrollo de E. carotovora, así como la síntesis de sus enzimas pectolíticos, pero esta acción depende no solo de la concentración del compuesto sino también de su estructura química, por lo que no siempre puede atribuirse la defensa del vegetal a los derivados del fenol.

Hemos visto que el haba muestra el valor mas alto de los determinados como sustancias reductoras, y que en sus tejidos existen entre otros aminoácidos libres fenil-alanina y tirosina, por lo tanto no es de extrañar que estos aminoácidos aromáticos, sintetizados a partir de carbohidratos, sirvan como precursores en la síntesis de fenoles. Ahora bien ¿cuál es el papel de estos fenoles

en la enfermedad del haba? muy simple, van a actuar de sustrato de fenolasas, (activadas por determinados metabolitos), para comunicar un ennegrecimiento a las zonas lesionadas por E. carotovora indicando así cómo va progresando la infección.

En el caso de col y judía no hemos visto derivados fenólicos, si bien el mayor contenido de carbohidratos en col podría también conducir a compuestos de este tipo mas o menos enmascarados y con una función muy específica, como es la síntesis de ligninas, que al actuar de barrera protectora defienden a la col del ataque de la bacteria.

Las fenolasas son enzimas que existen en el haba y que aumentan a medida que avanza su enfermedad, según hemos determinado, pero que son incapaces de actuar en la planta sana a pesar de que en ella existe el sustrato adecuado. Esto es facil de comprender si se considera que por una parte este sustrato suele localizarse según PRISTUPA y col. (88) en las vacuolas de la célula, no en el protoplasma ni núcleo y solamente puede ponerse en contacto con el enzima correspondiente cuando, como

consecuencia de la enfermedad, se alteran las estructuras vegetales y queda destruida la permeabilidad de membrana. Pero además se da la circunstancia de que las fenolasas, cuya localización no se ha determinado con precisión, han de ser activadas por una serie de metabolitos que aparecen como consecuencia de la acción de enzimas pectolíticos, lo que hace que el mecanismo por el cual avanza E. carotovora adopte pasos diferentes según la composición del tejido vegetal, tal como vemos ocurrir en plantas de haba o de judía.

Los profundos cambios químicos que lleva consigo la destrucción del tejido vegetal van acompañados de un aumento en los valores de pH, que en el caso de plantas de haba vemos se aproxima a las dos unidades.

La influencia del pH en el material atacado por microorganismos fitopatógenos ha sido señalada por MURANT y WOOD (80) en sus experiencias con patata y más tarde con manzana, y confirmada por otros muchos autores. La intervención de este factor en el proceso infeccioso afecta no solamente al desarrollo del agente

microbiano sino también a la síntesis de sus enzimas que deciden el curso de la infección. Ahora bien, si tenemos en cuenta que el pH de un tejido no indica tan solo un estado de acidez o alcalinidad, sino que dicho estado se alcanza por contribución de muy variados compuestos, hemos de admitir que en la interacción huésped:parásito un mismo valor de pH puede o no coadyuvar al establecimiento de la infección, dependiendo de la naturaleza de aquellas sustancias químicas que deciden los valores de pH que el tejido vegetal presente.

Queremos de esta forma justificar la resistencia de plantas de col que con un pH 6'0 no permite el desarrollo de E. carotovora, que por el contrario crece libremente a expensas de haba y judía que contienen un pH menos favorable para la evolución normal de la bacteria. Por tanto para juzgar la intervención del pH en el curso de enfermedades vegetales no basta conocer su valor sino que es preciso estudiar las sustancias a las que se debe. En este aspecto debemos recordar los trabajos de HASSEBRAUK y KAUL (49) en relación con los ácidos málico, cítrico, oxálico y ascórbico del trigo y su infección con Puccinia triticina.

Cuando la planta llega a enfermar, nuestras experiencias señalan un aumento de pH, que además de facilitar la multiplicación celular, facilita notablemente la síntesis de los enzimas que permiten a E. carotovora propagar su infección, ya que los valores de pH, que la planta enferma presenta, son los mas adecuados para la producción de PG (115), PTE (99) y PATE (83).

También el grado de hidratación de los tejidos puede repercutir en la fisiología de la infección, puesto que hemos observado su alteración en las plantas que estudiamos. Los resultados en col son los mas elevados, pero a pesar de ello no intervienen en el proceso infectivo ya que la infección es eliminada por otros factores existentes. En cambio en los casos de judía y haba, la humedad puede favorecer la enfermedad y de hecho lo hace a través de distintos caminos. Uno de ellos consiste en ocupar los espacios intercelulares determinando la exclusión del oxígeno con lo que impide según LAPWOOD (67) la activación de los inhibidores de enzimas pectolíticos. La otra forma de favorecer la infección es facil de deducir en el caso de que el patógeno

sea E. carotovora, ya que por tratarse de una bacteria flagelada, podrá moverse con mayor rapidez gracias a la película acuosa que aparece en los espacios intercelulares, con lo que el avance de la infección será mas facil.

La pérdida de agua que experimentan los tejidos enfermos es comprensible por la desaparición de estructuras celulares, por lo que en este aspecto los datos que aportamos son un fiel reflejo de la destrucción que E. carotovora causa en el material que estudiamos.

Pasando a considerar los enzimas pectolíticos hemos de recordar que su distribución es amplísima dentro del reino vegetal y que juegan un importante papel en los procesos de maduración, alteración y degeneración de las plantas. De todos ellos es pectinesterasa (PE) el que con mas frecuencia se ha puesto de manifiesto en los órganos vegetales, así lo señalan UNBEHAUN y MOORE (124) en sus estudios con tabaco, que triplica la síntesis de este enzima al ser infectado con Thielaviopsis basicola y BATEMAN (8) que determina el doble de actividad PE en hipocotilo de judía enfermo por Rhizoc-

tonia solani respecto al sano. La síntesis de este enzima podemos relacionarla, de acuerdo con nuestras experiencias, con la resistencia a la enfermedad producida por E. carotovora, puesto que vemos que la planta de col, presenta valores muy bajos, casi inapreciables, en tanto que en judía y sobre todo en haba la actividad PE es muy alta, como alta es también su susceptibilidad. Cuando estas plantas enferman el incremento que se produce en el enzima es muy notable por alcanzar valores seis veces superiores en la judía y algo mas bajos para el haba.

Un dato interesante respecto a PE lo constituye el hecho de que no tenga actividad a pH alcalino, incluso en presencia de ClNa, y que tan solo sea activo en zona ácida, es decir, a valores de pH que corresponden al determinado en los tejidos de las plantas atacadas. Esta observación nos lleva a admitir que el enzima PE es uno de los que inician el proceso infectivo en la planta que E. carotovora ataca y prepara así el sustrato que requieren otros enzimas de la patogénesis vegetal como son PG y PATE. De acuerdo con BATEMAN (8)

podemos aceptar que pectinesterasa es uno de los componentes naturales de muchas plantas superiores y su intervención en la enfermedad vegetal podría interpretarse admitiendo con JANSEN y col. (56) que su retención en la pared celular se debe a fuerzas de tipo iónico. Sabemos por las experiencias de THATCHER (120) que una respuesta temprana a la infección es la destrucción de la permeabilidad en la membrana celular y FRIEDMAN y JAFFE (31) demuestran un aumento en conductibilidad eléctrica en tejidos vegetales enfermos, por lo que fácilmente se deduce que el incremento iónico observado puede decidir la liberación de PE, que de esta manera queda independiente de la membrana celular y puede alcanzar el material péctico que constituye su sustrato específico. HANCOCK (47) en sus estudios con Sclerotinia sclerotiorum recoge así mismo esta sucesión de hechos, para justificar el aumento y actividad de PE en los tejidos enfermos.

Aparte del material que la planta proporciona para que actúe PG, no hay duda que la actividad del enzima PE facilita, con bastante constancia, la dispo-

nibilidad del sustrato específico para poligalacturonasa. Si el origen de este enzima es bacteriano o de la planta no podemos decidirlo en este estudio por carecer de datos precisos. Lo cierto es que en las plantas sanas de col, haba y judía no aparece este enzima, cosa nada extraña puesto que también HANCOCK y MILLAR (46) señalan su ausencia en alfalfa, e incluso admiten que tampoco existe cuando esta planta es atacada por distintos hongos. Nosotros sí hemos podido observar PG en la planta que enferma y hemos llegado a sospechar que su presencia en los tejidos enfermos de haba y judía puede no ser debida tan solo a la bacteria sino que también inter venga la respuesta a la infección del propio huésped. BATEMAN (8) también apunta la posibilidad de que inter venga el huésped en la producción de PG por judía infectada con Rhizoctonia solani a pesar de que según estableció KERTERZ (62) el enzima PG no figura como constituyente normal de plantas superiores.

Cualquiera que sea su origen lo cierto es que poligalacturonasa aparece en los tejidos enfermos (47,15) y actúa sobre ácidos pécticos en conjunción con otro en-

zima, el PATE. La acción de ambos se complementa entre sí, puesto que aunque los dos enzimas actúan a pH alcalino, el PATE es estimulado por iones Ca^{++} (108) a diferencia de lo que sabemos ocurre cuando se trata de PG, ya que BATEMAN y LUMSDEN (9) entre otros autores, han demostrado que los iones Ca^{++} al reaccionar con las cadenas de ácidos pécticos dan lugar a estructuras que son inatacables por el enzima poligalacturonasa. Por su parte DEAN y WOOD (20) sostienen la intervención del enzima PATE en el llamado complejo "macerante".

Nosotros hemos podido observar la presencia de PATE en plantas sanas, a diferencia de lo que señalan HANCOCK y MILLAR (46) en alfalfa atacada por distintos tipos de hongos, si bien es cierto que nuestros resultados han sido positivos solo en las valoraciones efectuadas en la zona U.V., ya que cuando la lectura se hace a 548 m μ , ninguna de las tres plantas ensayadas posee este enzima. Esto parece indicar que el PATE que E. carotovora sintetiza es diferente al señalado por PAPA-VIZAS y AYERS (83) en guisantes infectados por distintas especies de Fusarium, puesto que en dicho caso el método mas sensible de valoración es el que emplea ATB.

HANCOCK (47) indica que tanto los tallos de tomate como de girasol no contienen poligalacturonato transeliminasa ni pectintranseliminasa, no obstante en nuestros ensayos hemos podido detectar PTE en las plantas de col, así como en los tejidos enfermos de haba y judía. Es posible que su origen sea bacteriano, si bien su presencia en una planta resistente como es la col pone de evidencia un posible origen de carácter vegetal que puede ser necesario para el metabolismo normal de la planta. De lo que no parece haber duda es que durante el proceso de patogénesis el enzima PTE contribuye a degradar las cadenas de pectina por mecanismo y en condiciones distintas a como procede PE, ya que los enzimas transeliminativos actúan a pH alcalino. Hay algunos autores, entre los que figuran EDSTROM y PHAFF (26) para los que PE compite con PTE por deesterificar la pectina y convertirla en sustrato no adecuado para pectintranseliminasa. Este caso, como otros posibles de interacción de enzimas estimamos es difícil de aclarar en tanto no pueda trabajarse con material de adecuado grado de pureza.

V. CONCLUSIONES

De todo el estudio que acabamos de exponer pueden deducirse como principales conclusiones las siguientes:

1. La bacteria que hemos considerado, Erwinia carotovora, es uno de los pocos microorganismos capaces de evolucionar normalmente en un medio donde dispone de pectina como única fuente de carbono.
2. Los enzimas de acción pectolítica que se han estudiado son de caracter inducible y la ausencia de material péctico, en el medio donde E. carotovora se encuentra, decide su incapacidad para sintetizarlos.
3. El caracter fitopatígeno de E. carotovora está en relación con los enzimas pectolíticos que produce, PG, PE, PATE y PTE. Los factores que inhiben su síntesis o actividad hacen a la bacteria no patógena.
4. Los enzimas PG, PATE y PTE se sintetizan durante la fase logarítmica de crecimiento, en tanto que PE alcanza su máximo en la fase estacionaria de la bac-

teria. La velocidad de síntesis de estas enzimas puede contribuir a la manifestación de la enfermedad en el huésped atacado o bien a su resistencia.

5. PE precisa para actuar de Na^+ , y PATE y PTE requieren la presencia de Ca^{++} , que por el contrario inhibe, a ciertas concentraciones, la acción de PG.

6. La composición química del tejido vegetal puede llegar a desempeñar un importante papel en la defensa frente al ataque de E. carotovora. Así la relación entre el contenido en Nitrógeno protéico y Nitrógeno inorgánico es mas alta en las plantas resistentes, mostrando cifras inferiores a la mitad cuando la planta es sensible.

7. El análisis de aminoácidos libres en plantas de col, judía y haba revela, como dato relacionado con la resistencia de la col, la presencia de treonina y prolina, que no aparecen en las plantas sensibles.

8. El paso de tejido vegetal sano a enfermo implica una serie de modificaciones metabólicas que conducen a cambios cuantitativos y cualitativos de sus aminoácidos libres, que no se deben exclusivamente al consumo o aporte por parte del patógeno sino a la respuesta de la planta ante el ataque de la bacteria.

9. Cuando la planta de haba es atacada por E. carotovora, se observa la desaparición de arginina, serina y ácido aminobutírico y por el contrario se detecta ácido aspártico. En cambio al enfermar la planta de judía el número de sus aminoácidos libres aumenta por aparecer cuatro nuevos que son: histidina, arginina, glicina y tirosina.

10. La bacteria E. carotovora se propaga fácilmente a través de plantas que contienen cantidades distintas de sustancias reductoras como son haba y judía (con 5'52 y 1'2 mg/g.), en tanto que no puede invadir otras como la col con un contenido intermedio entre el presentado por aquellas.

11. El avance de la infección en haba transcurre principalmente a expensas de sustancias reductoras y en el caso de plantas de judía, E. carotovora apenas utiliza los compuestos de esa naturaleza, pero en cambio metaboliza rápidamente todas las sustancias pécticas.

12. La composición cualitativa de azúcares en las plantas estudiadas no justifica su respuesta al ser atacadas por E. carotovora ya que hemos visto que en col y judía existe el mismo tipo de estos compuestos.

13. Se sugiere la posibilidad de una represión enzimática producida por azúcares, que pueden ser distintos, pero que han de encontrarse en una determinada concentración.

14. De las tres plantas que consideramos tan solo el haba contiene derivados fenólicos, que intervienen en el avance de la enfermedad y comunican el ennegrecimiento que se observa al ser transformados por fenolasas.

15. Entre los enzimas vegetales es PE el que consideramos relacionado con la susceptibilidad a la enfermedad por haber comprobado su presencia predominantemente en plantas susceptibles. Por los factores que favorecen su actividad, podemos decir que PE es uno de los agentes con que se inicia la degeneración de la planta.

16. PG solo se manifiesta en los tejidos vegetales enfermos, pudiendo atribuirse su síntesis no solo a la respuesta del huésped sino a la propia bacteria.

17. La existencia de PATE en las tres plantas sanas que se estudian, ha sido posible solamente cuando se sigue el método de determinación a 230 mu.

18. El enzima PTE se ha detectado no solo en los tejidos enfermos, sino también en el de planta sana resistente lo que parece evidenciar su posible origen vegetal.

19. Como conclusión final se establece el carácter fitopatógeno de E. carotovora, así como la importancia que la composición del tejido vegetal tiene en el establecimiento de la enfermedad, habiéndose marcado diferentes pasos que pueden justificar cómo procede la bacteria en cada una de las plantas que ataca, de acuerdo a las interrelaciones que se presentan.

VI. SUMMARY
=====

We have tried in this study to know the circumstances under which a bacteria appears as phytopathogenic, and the factors that enable a plant to resist or succumb to a particular infection.

Among the diverse vegetable diseases produced by bacteria we decided to consider those that progress with the softening of the parenchymal cells, this being a symptom which can be rapid and easily detected.

As the pathogenic bacteria in this type of disease we chose Erwinia carotovora, which was among that we have studied, the one which demonstrated the greatest degree of infectiousness and the fewest nutritional requirements.

The plants which were used in this study were carefully selected to ensure that they would exhibit a distinct response in our attempt to produce in them the disease caused by E. carotovora. It is note worthy that



there is no narrow botanical similarity among the hosts of the bacteria. thus our choices were:

a) *Brassica oleracea*, which demonstrated total resistance to *E. carotovora* in spite of the fact that the experiment employed all modes of penetration of the bacteria including the most violent. The plant is not only not susceptible to the disease but responds to the lesion produced by rapidly forming a scar. There is no degeneration in the plant.

b) *Phaseolus vulgaris*, which when inoculated with *E. carotovora*, shows a loss of consistency in the attacked area where the plant bends and then begins to dry and dies.

c) *Vicia faba*, which exhibits a marked sensibility to *E. carotovora*. A rapid degeneration begins with the generalization of the inicial lesions; the process overcomes the plant and killing it in 18-20 hours. The phenolic content of this plant is in accordance with the blackening of the affected zones. This is a good indicator of the progress of the infection.

We developed our plan of study considering two aspects, first the factors that might aid or hinder the pathological character of E. carotovora, and secondly the principal characteristics of the plants which we indicated as possible hosts. Finally we correlated these two aspects in order to explain the results obtained from the union host-parasite in each of the cases studied.

The tests which we employed on the pathogen were to determine its nutritive requirements in connexion with cellular enzymatic production. In order for the bacteria to develop on a plant it must not only multiply but synthesize a series of enzymes as well which will enable it to pass through the vegetable tissue. The enzymes about which we are concerned are those which have the property of degrading the cellular wall. Among these the most important are those which act on pectic substances.

The pectolytic enzymes studied in E. carotovora were polygalacturonase (PG), pectinesterase (PE), polygalacturonic acid trans-eliminase (PATE) and pectin-trans-eliminase (PTE).

We have seen that E. carotovora can grow perfectly in a medium with pectin as the sole source of carbon and that its enzymes are induced in the presence of pectin. In addition we determined the pH at which these enzymes act, the factors that influence their activity and the requirements of Na^+ for PE enzyme and Ca^{++} for PATE and PTE.

Before the three plants mentioned earlier had attained the flowering stage, they were exposed to the action of E. carotovora and were observed until they were destroyed by the bacterial infection. In both the healthy (before inoculation) and diseased plants, determinations were made of a series of chemical substances, physical-chemical characteristics and enzyme content. In the last item, the same enzymes were studied as in E. carotovora. To these we added the study of phenolases because of their role in the symptomatology present in the *Vicia faba* plant.

A significant difference between the susceptible and resistant plants was the inorganic nitrogen content which was higher in the susceptible plants. At the same time, the higher the proportion of proteic nitrogen to non-

proteic nitrogen, the greater the resistance of the plant, this proportion is lowest in the broad bean which is the most susceptible plant, and double this proportion in the cabbage which is completely resistant.

An analysis of the free amino acids in the three plants showed no important difference among them from the quantitative point of view. However qualitatively, the results support the "Theory of Nutrition" of GARBER and LEWIS. An interesting point was the presence of threonine and proline only in the resistant plant. The characteristics of the host determined the course of the metabolic alteration suffered by each plant during its infection. For example, in the infected bean, the number of amino acids increased while in the broad bean they decreased.

The pectic substances in the vegetable are also destroyed easily as the disease continues. The same also occurs with all substances of a reducing character. However in this case the disappearance is more marked in the broad bean where the disappearance reaches 69 % versus the bean where only 4'5 % disappears.

Resistance and the evolution of the disease are influenced by the concentration of free sugars rather than their type. We can thus refer to high and low sugar diseases and classify them in this way as some authors have done. The action of sugars in increasing resistance can be explained as a catabolic repression of the synthesis of induced enzymes.

The pectolytic enzymes which take part in metabolic functions can be an element in determining whether a plant is a host to a pathogen. As we have seen, pectinesterase is the most typical of these enzymes which make plants susceptible to E. carotovora. The enzyme acts at a pH which corresponds to that of vegetable tissue, and it increases as the disease progresses. This increase is a consequence of an ionic increase which occurs in the plant and stimulates the liberation of PE from its place in the membrane. After contact with its specific substrate, the reaction product is attacked by another type of enzymes such as PG and PATE. Of these, the origin of PG is the most disputed. As it appears in infected tissue and not in healthy, it can be attributed to the pathogen and not the plant.

Though the factors that the phytopathogen, E. carotovora, requires for its development may be present in a particular plant, this does not mean that it is susceptible to it because of the inter-relation among all the factors. This inter-relation would explain for example why the cabbage with a higher content of reducing substances than the bean, does not permit colonization by E. carotovora. This can be explained by the repressive influence of sugars or by the transformation of phenolic compounds, which are more or less masked and have a very specific role, such as in the synthesis of lignine. So, substances which are not normally injurious to the bacteria could become so through reaction with other cellular components.

Inter-relation are also responsible for the different forms of evolution of the disease produced by the some bacteria. We have seen that the broad bean contains phenolic compounds and also phenolase, and as a consequence of the destruction of the cellular membrane, both factors get in touch and determine the blackening of the injured areas.

As we can see the mechanism by which E. carotovora succeeds is varied depending upon the composition of the vegetable tissue. When the active plant destroys one of the necessary components or produces another which is inhibitory to the pathogen, the infection is prevented by the chemical defense of the plant.

On the other hand, it is clear from the results, that the same phytopathogenic microorganism acts in different ways according the type of attacked plant.

VII. BIBLIOGRAFIA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

- 1.- ALBERSHEIM, P. NEUKOM, H. and DEUEL, H. 1960. Über die Bildung von ungesättigten Abbanprodukten durch ein pektinabbanendes Enzym. Helvet. Chim. Acta. 43: 1422-1426.
- 2.- ALTEN, F. and ORTH, H. 1941. Untersuchungen über dem Aminosäuregehalt und die Auffälligkeit der Kartoffel gegen die Krant- und Knollenfäule (Phytophthora infestans de By) Phytopathol. Z. 13: 243-271.
- 3.- Van ANDEL, O. M. 1966. Amino acids and plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 4: 349-368.
- 4.- APPEL, O. 1902. Zur Kenntnis der Bacterenfaule der Kartoffeln. Ber. dtsh. Bot. Ges. 20: 128.
- 5.- ATTI, G. 1916. Ann. R. Scuola Sup. Portici Sci. II-14.
- 6.- AYERS, W. A. PAPAIVIZAS, G. C. and DIEM, A. F. 1966. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by Rhizoctonia solani. Phytopathol. 56: 1006-1011.

- 7.- AYRES, A. DINGLE, J. PHIPPS, A. REID, W.W. and SOLOMONS, G.L. 1952. Enzymic degradation of pectic acid and the complex nature of polygalacturonase. *Nature*. 170: 834-836.
- 8.- BATEMAN, D.F. 1963. Pectolytic activities of culture filtrates of *Rhizoctonia solani* and extracts of *Rhizoctonia* infected tissues of bean. *Phytopathol.* 53: 197-204.
- 9.- BATEMAN, D.F. and LUMSDEN, R.D. 1965. Relation of Calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* 55: 734-738.
- 10.- BATEMAN, D.F. and MILLAR, R.L. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathol.* 4: 119-146.
- 11.- BERGEY'S Manual of determinative bacteriology. 1948. 6th Ed. Willians and Wilkins (Editors) Baltimore.
- 12.- BLOCK, R.J. and BOLLING, D. 1951. The aminoacid composition of proteins and foods. C.C. Thomas Springfield. Illinois.

- 13.- BRISOU, J. Etude de quelques Pseudomonadaceae. Imprimerie A. Baillet. Bordeaux.
- 14.- BURRILL, T.J. 1881. Bacteria as a cause of disease in plants. Amer. Nat. 15: 527-531.
- 15.- BYRDE, R.J.W. and FIELDING, A.H. 1968. Pectin methyltrans-eliminase as the maceration factor of *Sclerotinia fructigena* and its significance in brown rot of apple. J. Gen. Microbiol. 52: 287-297.
- 16.- Mc. COMB, E.A. and Mc. CREADY, R.M. 1952. Colorimetric determination of pectic substances. Anal. Chem. 24: 1630-1632.
- 17.- Mc. COMBS, C.L. and WINSTEAD, N.N. 1964. Changes in sugars and amino acids of cucumber fruits infected with *Pythium aphanidermatum*. Phytopathol. 54: 233-234.
- 18.- DAVIS, B.R. and EWING, W.H. 1964. Lypolytic, pectolytic and alginate activities of Enterobacteriaceae. J. Bacteriol. 88: 16-19.
- 19.- DAVISON, F.R. and WILLAMAN, J.J. 1927. Bot. Gaz. 73: 329-361.

- 20.- DEAN, M. and WOOD, R.K.S. 1967. Cell wall degradation by a pectate transeliminase. *Nature* 214:408-410.
- 21.- DEESE, D.C. and STAHMANN, M.A. 1962. Pectic enzymes in *Fusarium* infected susceptible and resistant tomato plants. *Phytopathol.* 52: 255-260.
- 22.- DEMAIN, A.L. and PHAFF, H.J. 1954. Composition and action of yeast polygalacturonase. *Nature* 174: 515.
- 23.- DEMAIN, A.L. and PHAFF, H.J. 1957. Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. *Wallerstein Labs. Commun.* 20: 119-140.
- 24.- DEVERALL, B.J. and WOOD, R.K.S. 1961. Chocolate spot of beans (*Vicia faba*). Interactions between phenolase of host and pectic enzymes of the pathogen. *Ann. Appl. Biol.* 49: 473-487.
- 25.- DOMINGUEZ GARCIA TEJERO, F. 1961. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. Editorial DOSSAT S.A. Madrid.
- 26.- EDSTROM, R.D. and PHAFF, H.J. 1964. Purification and certain properties of pectin trans-eliminase from *Aspergillus fonsecaens*. *J. Biol. Chem.* 239: 2403-2408.

- 27.- ELGERSMA, D.M. 1967. Factors determining resistance of elms to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathol.* 57: 641-642.
- 28.- FELDMAN, A.W. and HANKS, R.W. 1964. Quantitative changes in the free and protein amino acids in roots of healthy, *Radopholus similis*-infected and "recovered" grapefruit seedlings. *Phytopathol.* 54: 1210-1215.
- 29.- FELDMAN, A.W. and HANKS, R.W. 1966. Quantitative changes in free and protein amino acids in leaves of healthy, *Radopholus similis* infected, and recovered grapefruit seedlings. *Phytopathol.* 56:261-264.
- 30.- FISCHER, A. 1897. *Vorlesungen über Bakterien.* Jena.
- 31.- FRIEDMAN, B.A. and JAFFE, M.J. 1960. Effect of soft rot bacteria and pectolytic enzymes on electrical conductance of witloof chicory tissue. *Phytopathol.* 50: 272-274.
- 32.- FRIEDMAN, B.A. and CEPONIS, M.J. 1964. Acid production by *Erwinia carotovora* in vivo as a factor in virulence. *Phytopathol.* 54: 237.

- 33.- FROBISHER, M. 1947. Elementos de Bacteriología. Salvat editores. S.A. Barcelona.
- 34.- GARBER, E.D. 1956. A nutrition-inhibition hypothesis of pathogenicity. Ann. Naturalist. 90: 183-194.
- 35.- GARBER, E.D. and SHAEFFER, S.G. 1957. Free histidine content of turnip varieties and their resistance to histidine requiring mutants of *Erwinia aroideae*. J. Bacteriol. 74: 392-395.
- 36.- GARBER, E.D. 1961. Wildfire disease of tobacco. J. Bacteriol. 81: 974-978.
- 37.- GARDNER, M.W. and KENDRICK, J.B. 1921. Bacterial spot of tomato. J. Agric. Res. 21: 123-156.
- 38.- GASSNER, C. and FRANKE, W. 1934. Der Stickstoffhaushalt junger Weizenpflanzen in seiner Abhängigkeit von der Mineralsalzernährung. Ein Beitsag zum Problem der Rostresistenz. Phytopathol. Z. 7: 187-222.
- 39.- GAUMANN, E. and BOHNI, E. 1947. Über adaptative Enzyme bei parasitischem Pilzen. II. Helv. Acta. 30: 24-38.

- 40.- GRAHAM, D.C. et DOWSON, W.J. 1960. The coliform bacteria associated with potato black-leg and other soft rots. I. Their pathogenicity in relation to temperature. *Ann. Appl. Biol.* 48: 51-57.
- 41.- GREATHOUSE, G.A. and RIGLER, N.E. 1940. The chemistry of resistance of plants to *Phymatotrichum* root rot. IV. Toxicity of phenolic and related compounds. *Amer. J. Bot.* 27: 99-108.
- 42.- GRUMMER, G. 1955. Die Beziehungen zwischen dem Eiweissstoffwechsel von Kulturpflanzen und ihrer Anfälligkeit gegen parasitische Pilze. *Phytopathol. Z.* 24: 1-42.
- 43.- Van HALL, C.J.J. 1902. *Bijdragen tot de Kennis der Bakteriele Plantenziekten*. Inaug. Diss. Univ. Amsterdam.
- 44.- HAMON, Y. and PERON, Y. 1961. Les propriétés antagonistes reciproques parmi les *Erwinia*. Discussion de la position taxonomique de ce genre. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 253: 913-915.
- 45.- HANCOCK, J.G. MILLAR, R.L. and LORBEER, J.W. 1964. Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Botrytis allii*, *B. cinerea* and *B. squamosa* in

- vitro and in vivo. *Phytopathol.* 54: 928-931.
- 46.- HANCOCK, J.G. and MILLAR, R.L. 1965. Relative importance of polygalacturonate trans-eliminase and other pectolytic enzymes in Southern anthracnose, spring black stem, and *Stemphylium* leaf spot of alfalfa. *Phytopathol.* 55: 356-360.
- 47.- HANCOCK, J.G. 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathol.* 56: 975-979.
- 48.- HARRISON. *De Plant Pathology.* Walker, J.C. 1950. McGraw-Hill Book Company. INC. New York.
- 49.- HASSEBRAUK, K.K. and KAUL, R. 1957. Vergleichende chemische Untersuchungen des Atmungsstoffwechsels von Weizenpflanzen unterschiedlicher Braunrostanfälligkeit. *Phytopathol. Z.* 29: 305-326.
- 50.- HEITFUSS, R. BUCHANAN-DAVIDSON, D.I. STAHMANN, M.A. and WALKER, J.C. 1960. Electrophoretic and immunochemical studies of proteins in cabbage infected with *Fusarium oxysporum* f. *conglutinans*. *Phytopathol.* 50: 198-205.

- 51.- HOBSON, G.E. 1963. Pectinesterase in normal and abnormal tomato fruit. *Biochem. J.* 86: 358-365.
- 52.- HORSFALL, J.G. and DIMOND, A.E. 1957. Interactions of tissue sugar, growth substances, and disease susceptibility. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz.* 64: 415-421.
- 53.- INMANN, R.E. 1962. Disease development, disease intensity, and carbohydrate levels in rusted bean plants. *Phytopathol.* 52: 1207-1211.
- 54.- JACOBS, M.B. GERSTEIN, M.J. WALTER, W.G. 1957. *Dictionary of Microbiology.* D. van Nostrand Company INC. New York.
- 55.- JANSEN, E.F. and Mc. DONNELL, L.R. 1945. Influence of methoxyl content of pectic substances on the action of polygalacturonase. *Arch. Biochem.* 8: 97-112.
- 56.- JANSEN, E.F. JANG, R. and BONNER, J. 1960. Binding of enzymes to *Avena* coleoptile cell walls. *Plant. Physiol.* 35: 567-574.
- 57.- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique.* Mc. Graw-Hill Book Company INC. New York.

- 58.- JONES, L.R. 1901. *Bacillus carotovorus* n. sp. die Ursache einer weichen Fäulnis der Mohre. Zbl. Bakt. 2, Abt. 7, 12-61.
- 59.- KARGAPOLOVA, N.N. 1937. Anatomical characteristics of various sorts and species of potato, differing in resistance to *Phytophthora infestans*. Immunity of agricultural plants (Immunitet sol'skokhoz rastenii). Publ. by VASKHNIL, 215-226.
- 60.- KAUFFMANN, F. 1959. Int. Bull. Bact. Nom. Taxon 9: 1.
- 61.- KEEN, N.T. and HORTON, J.C. 1966. Induction and repression of endopolygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. Can. J. Microbiol. 12: 443-453.
- 62.- KERTERZ, Z.I. 1951, b. The pectic substances. Interscience Publisher Ltd. London.
- 63.- KIRKHAM, D.S. 1957. Studies of the significance of polyphenolic host metabolites in the nutrition of *Venturia inaequalis* and *Venturia pirina*. J. Gen. Microbiol. 17: 120-134.

- 64.- KLEMENT, Z. and GOODMAN, R.N. 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 5: 17-44.
- 65.- KOCH, R. 1912. Die Actiologie der Milzbrand-krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. 1876, vol.1. Gesammelte Werke von Robert Koch. Leipzig.
- 66.- KRAGHT, A.J. and STARR, M.P. 1953. Pectic enzymes of *Erwinia carotovora*. *Arch. Biochem. Biophys.* XLII 271-277.
- 67.- LAFWOOD, D.H. 1957. Studies in the physiology of parasitism. XXIII. On the parasitic vigour of certain bacteria in relation to their capacity to secrete pectolytic enzymes. *Ann. Botany (London)* 21: 167-184.
- 68.- LATO, M. BRUNELLI, B. CIUFFINI, G. and MEZZETTI, T. 1968. Analysis of carbohydrates in biological fluids by means of thin layer chromatography. *J. Chromatog.* 36: 191-197.
- 69.- LAYNE, E. 1957. In *methods in Enzymology*. Vol. 3. Ed. by Calowick, S.P. and Kaplan, N.O. Academic Press INC. New York.



- 70.- LEWIS, R.W. 1962. Effects of some metabolites on the susceptibility of rye to *Claviceps purpurea*. *Phytopathol.* 52: 973-975.
- 71.- De LEY, J. 1968. DNA base composition of yellow *Erwinia* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 34:257-262.
- 72.- De LEY, J. 1970. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 101: 738-754.
- 73.- LOCKHART, W.R. and KOENING, K. 1965. Use secondary data in numerical taxonomy of genus *Erwinia*. *J. Bacteriol.* 90: 1638-1644.
- 74.- MANDEL, M. 1969. New approaches to bacterial taxonomy: Perspective and prospects. *Ann. Rev. Microbiol.* 23: 239-274.
- 75.- MARTIN, J.T. 1964. Role of cuticle in the defense against plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 81-100.
- 76.- MARTINEC, T. and KOCUR, M. 1963. Taxonomická studie rodu *Erwinia*. *Folia (Biol 2) Fac. Sci. Nat. Univ. Purkynianae. Brunensis.* 4: 1-163.

- 77.- MAXWELL, D.P. and BATEMAN, D.F. 1967. Changes in the activities of some oxidases in extracts of *Rhizoctonia* infected bean hypocotyls in relation to lesion maturation. *Phytopathol.* 57: 132-136.
- 78.- De MIGUEL, M. 1969 Estudio de los principales compuestos polifenólicos de uva blanca, variedad moscatel. I. Polifenoles de las partes sólidas de la uva. *Ann. Bromat.* 21: 132-147.
- 79.- MOFFAT, E.D. and LITTLE, R. 1959. Polychromatic technique for the identification of aminoacids on paper chromatograms. *Anal. Chem.* 31: 926-928.
- 80.- MURANT, A.F. and WOOD, R.K.S. 1957. Factors affecting the pathogenicity of bacteria to potato tubers. *Ann. Appl. Biol.* 45: 635-649.
- 81.- NASUNO, S. and STARR, M.P. 1967. Polygalacturonic acid trans-eliminase of *Xanthomonas campestris*. *Biochem. J.* 104: 178-185.
- 82.- NELSON, K.E. 1951. Factors influencing the infection of grapes by *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.* 41: 319-326.

- 83.- PAPAIVIZAS, G.C. and AYERS, W.A. 1966. Polygalacturonate trans-eliminase production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. *Phytopathol.* 56:1269-1273.
- 84.- PATEL, P.N. and WALKER, J.C. 1963. Changes in free amino acid and amide content of resistant and susceptible beans after infection with the halo blight organism. *Phytopathol.* 53: 522-528.
- 85.- PEGG, G.F. and SEQUEIRA, L. 1968. Stimulation of aromatic biosynthesis in tobacco plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathol.* 58: 476-483.
- 86.- PREVOT, A.R. 1961. *Traité de systematique bacterienne.* Dunod Editeur. Paris.
- 87.- PRIDHAM, J.B. 1959. *Phenolics in plants in health and disease.* Pergamon Press. Oxford.
- 88.- PRISTUPA, N.A. PETROVA, R.K. SHALAMBERIDZE, T. Kh. 1970. Histochemical detection of polyphenols in plant material. *Tsitologiya.* 12: 403-407.

- 89.- RICH, S. and HORSFALL, J.G. 1954. Relation of polyphenol oxidases to fungi toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 40: 139-145.
- 90.- ROEMER-FUCHS-ISENBECK. 1938. Die Züchtung resistenter Rassen der Kulturpflanzen. Verlag Paul Parey. Berlin.
- 91.- ROHRINGER, R. STAHMANN, M.A. and WALKER, J.C. 1958. Biochemical changes in plant disease: Effect of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* and its metabolites on leaf constituents of susceptible and resistant tomatoes. J. Agr. and Food Chem. 6: 838-843.
- 92.- ROHRINGER, R. and SAMBORSKI, D.J. 1967. Aromatic compounds in the host-parasite interaction. Ann. Rev. Phytopathol. 5: 77-86.
- 93.- RUBIN, B.A. and ARTSIKHOVSKAYA, V.Ye. 1963. Biochemistry and Physiology of plant immunity. Pergamon Press. New York.
- 94.- RUDOLPH, K. 1963. Weitere biochemische Untersuchungen zum Wirt-Parasit-Verhältnis am Beispiel von *Puccinia graminis tritici*, I. Der Einfluss der Infektion auf den Säurestoffwechsel. Phytopathol. Z. 46: 276-290.

- 95.- RUIZ de GARDOA, J. 1959. Principales plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. Tell. Tip. Egaña. Vitoria.
- 96.- RUSSELL, G.E. 1968. The influence of foliar applications of sugars on the susceptibility of sugar beet to downy mildew. Ann. Appl. Biol. 61:381-386.
- 97.- SAVULESCU, T. 1936. L'immunité aux maladies bactériennes des plants. Rapp. III Congr. Internat. de Pathologie comparée 1, part. 2: 183-251.
- 98.- SCHAAL, L.A. JOHNSON, G. and SIMMONS, A.O. 1953. Comparison of scab resistance of potato tubers as indicated by the ferric chloride test. Ann. Potato. J. 30: 257-262.
- 99.- SHERWOOD, R.T. 1966. Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. Phytopathol. 56: 279-286.
- 100.- SING, D. and SMALLEY, E.B. 1966. Nitrogenous compounds in the xylary sap of Ulmaceae species varying in resistance to dutch elm disease. Phytopathol. 56: 901.

- 101.- SMITH, E.F. 1895. *Bacillus tracheiphilus* sp. nov.,
die Uvssache die Verwelkens verschiedener Cucur-
bitaceen. Zentbl. f. Bakt. Abt. II, 1: 364-373.
- 102.- SMITH, F.G. WALKER, J.C. and HOOKER, W.J. 1946.
Effect of hydrogen-ion concentration on the to-
xicity to *Colletotrichum circinans* (Berk.) Vogl.
of some carboxylic acids, phenols and crucifer
extracts. Amer. J. Bot. 33: 351-356.
- 103.- SMITH, I. 1953.- Colour reactions on paper chromato-
grams by a dipping technique. Nature 171:43-44.
- 104.- SMITH, W.K. 1958. A survey of the production of pec-
tic enzymes by plant pathogenic and other bacte-
ria. J. Gen. Microbiol. 18: 33-41.
- 105.- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugars determination.
Biol. Chem. 195: 19-23.
- 106.- SPALDING, D.H. BRUHL, G.W. and FOSTER, R.J. 1961.
Possible roles of pectinolytic enzymes and po-
ly-saccharide in pathogenesis by *Cephalosporium*
gramineum in wheat. Phytopathol. 51: 227-235.
- 107.- STAKMAN, E.C. 1957. Progress and problems in the de-
velopment of disease resistant varieties of crops
plants. Proc. Internat. Congr. Crop Protection.

- 108.- STARR, M.P. and MORAN, F. 1962. Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. *Science*. 135: 920-921.
- 109.- STARR, M.P. and MANDEL, M. 1969. DNA base composition and taxonomy of phytopathogenic and other Enterobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 56:113-123.
- 110.- STAPP, C. 1961. Bacterial plant pathogens. Oxford University Press. London.
- 111.- STRETCH, A.W. and CAPPELLINE, R.A. 1965. Changes in free amino acids and reducing sugars in high-bush blueberry fruit infected with *Glomerella cingulata*. *Phytopathol.* 55: 302-303.
- 112.- SUBBARAYNDN, S. and WILCOXSON, R.D. 1967. Effect of mannose on infection of *Gomphrena globosa* by red clover vein mosaic virus. *Phytopathol.* 57: 1292-1295.
- 113.- SUKHORUKOV, K.T. GERBER, E.Kh. BARABANOVA, G.P. and BORODULINA, N.A. 1933. Biochemistry of plant immunity. *Uch. Zap. Sarat. Gos. Un-ta*, 10, n^o 1.
- 114.- SWINBURNE, T.R. and CORDEN, M.E. 1969. A comparison of the polygalacturonase produced in vivo and

- in vitro by *Penicillium expansum* thom. J. Gen. Microbiol. 55: 75-87.
- 115.- TEJERINA, G. y FERNANDEZ, P. 1966. Efecto del pH en la producción de enzimas pectolíticos. Ann. Bromat. 18: 67-72.
- 116.- TEJERINA, G. 1968. Intervención de los fenoles en las enfermedades de las plantas. Ann. Bromat. 20: 313-332.
- 117.- TEJERINA, G. 1969. Wirkung verschiedener Stickstoffquellen auf die Entwicklung und Polygalakturonaseproduktion von *Erwinia carotovora*. Z. allg. Mikrobiologie. 2: 61-68.
- 118.- TEJERINA, G. y SERRA, M.T. 1970. Respuesta de *Erwinia carotovora* a distintas fuentes de carbono. Microbiol. Españ. 22: 251-262.
- 119.- TEJERINA, G. and SERRA, M.T. 1971. The effect of sugars on the pathogenesis of *Erwinia carotovora*. Phytton. 28, (en prensa).
- 120.- THATCHER, F.S. 1942. Further studies of osmotic and permeability relations in parasitism. Can. J. Res. C. 20: 283-311.

- 121.- TOENNIES, G. and KOLB, J.J. 1951. Techniques and reagents for paper chromatography. Anal. Chem. 23: 823-826.
- 122.- TOMIYAMA, K. 1963. Physiology and biochemistry of disease resistance of plants. Ann. Rev. Phytopathol. 1: 295-324.
- 123.- TURNER, M.T. and BATEMAN, D.F. 1968. Maceration of plant tissues susceptible and resistant to soft-rot pathogens by enzymes from compatible host-pathogens combinations. Phytopathol. 58: 1509-1515.
- 124.- UNBEHAUN, L.M. and MOORE, L.D. 1970. Pectic enzymes associated with black root rot of tobacco. Phytopathol. 60: 304-308.
- 125.- VERNER, A.R. and KLING, Ye. G. 1934. Fruit immunity. Causes of resistance of water melons to black rot. Tr. Komissii Po Irrigatsii Akad Nauk SSSR. 3: 127-140.
- 126.- WAGGONER, P.E. and DIMOND, A.E. 1955. Production and role of extracellular pectic enzymes of *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Phytopathol. 45: 79-87.

- 127.- WAKKER, J.H. 1883. Vorläufige Mittheilungen über Hyacinthenkrankheiten. Bot. Centbl. 14: 315-317.
- 128.- WALDEE, E.L. 1945. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. Iowa Coll. J. Sci. 19: 435.
- 129.- WALKER, J.C. 1950. Plant pathology. Mc. Graw-Hill Book Company. INC. New York.
- 130.- WALKER, J.C. and STAHMANN, M.A. 1955. Chemical nature of disease resistance in plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 6: 351-366.
- 131.- WALTON, G.S. and CAPPELLINI, R.A. 1962. Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Erwinia carotovora*. Phytopathol. 52: 927.
- 132.- WEINHOLD, A.R. BOWMAN, T. and DODMAN, R.L. 1969. Virulence of *Rhizoctonia solani* as affected by nutrition of the pathogen. Phytopathol. 59: 1601-1605.
- 133.- WINFREE, J.P. COX, R.S. et HARRISON, D.S. 1958. Influence of bacterial soft rot, depth to water table, source of nitrogen, and soil fumigation on production of lettuce in the everglades Phytopathol. 48: 311-316.

- 134.- WOOD, J.I. 1953. Three billion dollars a year plant diseases. U.S. Dept. Agr. Yearbook. 1-9.
- 135.-WOODMAN, R.M. and BARNELL, H.A. 1937. The connection between the keeping qualities of commercial varieties of onions and the rates of water loss during storage. Ann. Appl. Biol. 24: 219-235.
- 136.- ZINSSER Microbiology. 1968. Fourteenth edition. Appleton Century Crofts. New York.