

## Inmunodetección de una exopoligalacturonasa en plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*

B. PATIÑO ÁLVAREZ, M. C. RODRÍGUEZ CÁMARA, T. RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, M. T. GONZÁLEZ JAÉN y C. VÁZQUEZ ESTÉVEZ

En el presente trabajo se ha detectado la presencia de una enzima exopoligalacturonasa en raíces de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL). La detección se ha llevado a cabo mediante inmunoensayos con anticuerpos policlonales obtenidos frente a la enzima purificada a partir de extractos de dicho hongo. De esta manera, se ha comprobado la expresión de una exopoligalacturonasa en tejidos infectados y el incremento de su expresión paralelamente al desarrollo de los síntomas visibles de la infección.

B. PATIÑO ÁLVAREZ, C. VÁZQUEZ ESTÉVEZ: Departamento de Microbiología III.  
M. C. RODRÍGUEZ CÁMARA, T. RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ: Departamento de Biología Vegetal I.  
M.T. GONZÁLEZ JAÉN: Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

**Palabras clave:** Tomate, FORL, exopoligalacturonasa, inmunodetección.

### INTRODUCCIÓN

*Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *radicis lycopersici* JARVIS y SHOEMAKER (1978) es un patógeno que coloniza la raíz de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) provocando podredumbre del cuello y de la raíz de la planta e incluso pudiendo llegar a producir un marchitamiento generalizado de la misma. La penetración del hongo tiene lugar principalmente por la zona de elongación de la raíz y puede verse facilitada por heridas o ataques de nemátodos (JARVIS y THORPÉ, 1976).

La principal barrera que tiene que salvar un patógeno vegetal para la colonización de los tejidos es la pared celular rica en polisacáridos. Para ello, el hongo fitopatógeno secreta un conjunto de enzimas capaces de

degradar las paredes vegetales del huésped entre las que, las pectinasas han recibido una mayor atención debido a su acción sobre la pectina, uno de los componentes principales de la pared celular vegetal y en especial, de la lámina media. La degradación de la pectina proporcionaría también los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo en el interior de la planta (DE LORENZO, *et al.*, 1996).

Las poligalacturonasas (PGs) son las primeras pectinasas que produce el hongo fitopatógeno cuando se cultiva *in vitro* sobre extractos de paredes celulares o durante la infección (JONES *et al.*, 1972), además su actuación parece ser un requisito esencial para la posterior actuación de otras enzimas degradativas (CAPRARI, *et al.* 1993). Según su modo de acción sobre el sustrato se deno-

minan endopoligalacturonasas y exopoligalacturonasas (endoPGs y exoPGs, respectivamente) y se les atribuye funciones diferentes en el proceso infectivo de las plantas hospedadoras. Las primeras rompen los enlaces  $\alpha$ -D-(1,4) glicosídicos al azar, en el interior de las moléculas de pectina dando lugar a oligogalacturónidos de elevado peso molecular, algunos de los cuales son capaces de inducir respuestas de defensa en la planta hospedadora, como la respuesta hipersensible bien caracterizada en numerosas interacciones incompatibles huésped-patógeno, la síntesis de fitoalexinas y la producción de etileno (HAHN, *et al.*, 1989; WALTON, 1994). La acción de estas enzimas sobre el sustrato se traduciría en una maceración rápida de los tejidos infectados (BATEMAN y BASHAM, 1976). Por el contrario, las exoPGs hidrolizan el enlace  $\alpha$ -D-(1,4) glicosídico de las moléculas de pectina secuencialmente comenzando por el extremo no reductor de la cadena liberando como producto el monómero, el ácido galacturónico, que es catabolizado en el interior celular del hongo y que, a su vez, sirve de inductor para la síntesis de otras enzimas pécticas (ALLEN, *et al.*, 1993). La acción de las exoPGs sobre los oligómeros liberados de las paredes vegetales por acción de endoPGs reduciría su capacidad elicitora de las respuestas de defensa de la planta hospedadora, favoreciendo así el progreso del hongo, permitiendo la colonización y el desarrollo de la enfermedad asociada.

Numerosos autores (BATEMAN y BASHAM, 1976; COOPER, 1987; HAHN, *et al.*, 1989) han descrito diversas evidencias bioquímicas que demuestran la relación entre las enzimas capaces de degradar la pared celular y los síntomas de las enfermedades causadas por patógenos vegetales. En el caso de las poligalacturonasas, aún cuando se reconoce la importancia de ambos tipos de enzimas durante el proceso de infección y desarrollo de las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos en general, y *Fusarium* en particular, la información disponible sobre endoPGs es más abundante que sobre exoPGs. En el caso concreto de *Fusarium*, se

ha detectado la presencia de la enzima endoPG o de su RNAm en plantas de tomate infectadas por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (ARIE, *et al.*, 1998, DI PIETRO y RONCERO, 1998). En el presente trabajo presentamos los resultados del análisis de detección de una exoPG producida por *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* en plantas infectadas de tomate y su relación con el progreso de la infección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismo y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se ha utilizado el aislamiento  $r_6$  del hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radicis lycopersici* Jarvis y Shoemaker (JARVIS y SHOEMAKER, 1978), proporcionado por el Dr. Tello (INIA, Madrid). Fue obtenido de cultivos monospóricos aislados a partir de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

El hongo se ha mantenido mediante resiembras periódicas en placas de agar patata dextrosa (PDA), en una estufa de cultivo a 25°C. A largo plazo el microorganismo se ha conservado, manteniendo las esporas en glicerol al 15% a -80°C. La capacidad infectiva del aislamiento se probó periódicamente por inoculación de plantas de tomate susceptibles al patógeno según describen SÁNCHEZ, *et al.* (1975).

### Inoculación de plantas de tomate

El material vegetal utilizado fueron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) var. Precodor susceptible a *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Las plantas se cultivaron en medio hidropónico en las condiciones descritas por DE CAL, *et al.*, 1997. Plantas crecidas en esas condiciones durante 14 días se inocularon añadiendo a la solución nutritiva una suspensión de conidios en agua a una concentración final de  $10^4$  conidios/ml (DE CAL, *et al.*, 1997).

### Toma de muestras y extracción de proteínas de la raíz

Las raíces se recogieron a los 14, 21 y 28 días después de la inoculación. Se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

La extracción de proteínas de la raíz se realizó según el siguiente protocolo: se trituró la raíz en un mortero tras añadir nitrógeno líquido hasta reducirla a polvo y posteriormente se resuspendió en tampón fosfato (0,1 M pH 6,8 con NaCl 1M, DTT 10mM) (10 ml/gr de peso fresco). Esta mezcla se centrifugó a 23000 g durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron con sulfato amónico al 85%. El precipitado así obtenido se resuspendió en agua destilada y se dializó frente a glicina al 1%. Estos extractos dializados se liofilizaron y guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización para los ensayos de inmunodetección mediante western-blot.

### Valoración de proteínas

La concentración de proteínas en los extractos de plantas se valoró según el método descrito por BRADFORD (1976), este método se basa en el cambio de absorción de 465 nm a 595 nm que experimenta una solución ácida de «Coomassie Brilliant Blue» al unirse a las proteínas. Los datos de absorbancia fueron referidos a una curva patrón con albúmina de suero bovino de una concentración de 400 y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (ensayo estándar y microensayo).

### Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las electroforesis se realizaron utilizando la cubeta «Miniprotean II», con geles de 1 mm de grosor. Se llevaron a cabo en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS), según el método descrito por LAEMMLI (1970). Para la determinación de la masa molecular de la poligalacturonasa se utiliza-

ron los marcadores de masa molecular de amplio rango preteñidos formados por una mezcla de miosina (208 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (115 kDa), BSA (79,5 kDa), ovoalbúmina (49,5 kDa), anhidrasa carbónica (34,5 kDa), inhibidor de la tripsina (28,3 kDa) y lisozima (20,4 kDa).

### Inmunodetección de la exopoligalacturonasa

Los anticuerpos policlonales frente a la exopoligalacturonasa se obtuvieron mediante la inoculación de conejos de raza neozelandesa con la exopoligalacturonasa purificada de *Fusarium oxysporum* f.p. *radicis lycopersici* aislamiento  $r_6$  siguiendo el método descrito por BENHAMOU, *et al.* (1991). La especificidad del suero fue ensayada por dot-blot y la inmunodetección mediante western-blot como se detalla a continuación. Se realizó una electroforesis, con 120 ng de proteína obtenida de extractos de raíz de planta control y planta infectada y posteriormente, las proteínas así separadas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  mediante la técnica de western-blot con el sistema «Mini-trans-blot electrophoretic transfer cell», utilizando como tampón de transferencia Tris-Glicina con metanol al 20%. La transferencia se llevó a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ , en agitación, durante 45 minutos a un voltaje constante de 100 v. Una vez finalizada la misma las membranas, para evitar la unión inespecífica a proteínas, se bloquearon durante 45 minutos con leche en polvo desnatada al 5% en tampón fosfato salino (1,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,5 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 mM de KCl y 140 mM de NaCl en agua destilada) (PBS). Transcurrido este tiempo se mantuvo toda la noche con el anticuerpo anti-poligalacturonasa a una concentración 1:10000 en la misma leche. Después de lavarlo con PBS, durante 30 minutos, cambiando el PBS cada 10 minutos, el filtro se incubó durante dos horas con el anticuerpo anti-inmunoglobulina G de conejo ligado a peroxidasa, a una concentración 1:5000 en leche-PBS. Para

revelarlo se utilizó una solución que contenía PBS (40 ml) y dos sustratos de la peroxidasa, diaminobencidina (10 mg en 5 ml de metanol) y 4-cloro1-naftol (15 mg en 5 ml de metanol), que al ser oxidados por la peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%) producía manchas de color marrón de distinta intensidad que depende directamente de la concentración de exopoligalacturonasa.

### DT-IBA (direct tissue-blotted immunobinding assay)

Se siguió el protocolo descrito por ARIE, *et al.*, 1998. Para ello se utilizaron raíces congeladas de planta control e infectada de 14, 21 y 28 días. Esta técnica consiste en el contacto directo de una sección de la raíz sobre una membrana de transferencia previamente equilibrada en PBS. Tras el contacto (diez segundos) la membrana se bloquea con leche desnatada al 5% en PBS, la inmunodetección y posterior revelado se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior.

## RESULTADOS

*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) produce *in vitro* una mezcla enzimática compleja, cuya actividad poligalacturonasa mayoritaria fue caracterizada como una poligalacturonasa que actúa sobre los extremos no reductores de los sustratos, liberando fundamentalmente monogalacturónico como producto de la reacción, por lo que presenta un modo de actuación típico de una exopoligalacturonasa. Esta exopoligalacturonasa ha sido purificada y caracterizada previamente (VÁZQUEZ, *et al.*, 1993) y se utilizó para la obtención de anticuerpos policlonales frente a la misma (PATIÑO, *et al.*, 1997) y con ellos iniciamos un seguimiento de la expresión de esta actividad en plantas infectadas.

Se realizaron dos tipos de ensayos, por un lado se procedió a la extracción de las prote-

ínas totales de la raíz de tomate, utilizando raíces de plantas control y raíces de plantas inoculadas con FORL después de 28 días y se realizó con ellas un western-blot. El segundo grupo de ensayos se realizó mediante el contacto directo de las raíces infectadas y control con una membrana de nitrocelulosa (DT-IBA) según se describe en materiales y métodos.

En el primer caso, las electroforesis previas a la transferencia (western-blot) se realizaron con 120 ng de proteína total por carril. Una vez revelada la membrana con los anticuerpos se puso de manifiesto la existencia de una banda inmunoactiva con una movilidad electroforética que nos indica una masa molecular de 66 kDa, similar a la exopoligalacturonasa mayoritaria purificada a partir de cultivos *in vitro* de FORL (VÁZQUEZ, *et al.*, 1993; PATIÑO, *et al.*, 1997). En el carril correspondiente a las proteínas de los extractos de la raíz control no se apreciaba ninguna banda inmunoactiva. Estos datos nos confirman la expresión *in planta* de una exoPG con características similares a la exoPG de FORL (Fig. 1).

La preparación de los extractos proteicos de plantas es una tarea laboriosa por lo que procedimos a utilizar la técnica DT-IBA, que es mucho más rápida y directa y nos conduce a resultados similares. Dentro de estos experimentos de contacto directo se realizaron unos con raíz infectada por FORL y otros con raíz control, ambas de 28 días. En este momento la raíz presentaba síntomas de infección generalizados (Fig. 2). Realizamos un corte transversal en la zona de la raíz próxima al cuello y se puso la sección así obtenida en contacto directo (diez segundos) con la membrana de transferencia. Tras revelarlo con los anticuerpos anti-exoPG pudimos observar cómo la señal de la raíz infectada es muy superior a la de la raíz control (Fig. 3). La gran similitud de las exoPGs de plantas y de hongos (KESTER, *et al.*, 1996) hacen previsible la aparición de alguna señal en los controles. Un experimento de hibridación tipo Southern realizado sobre DNA de tomate con una sonda del gen codificador correspon-

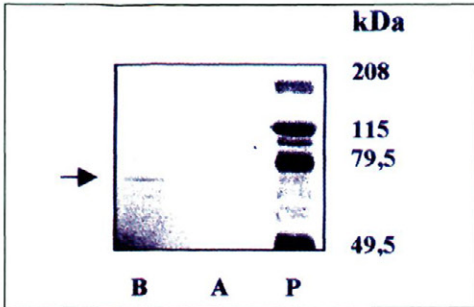


Fig. 1 - Western-blot realizado con extractos de proteínas de planta control (carril A) y planta infectada con *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (carril B) ambas de 28 días. El carril P corresponde a los patrones de masa molecular. La flecha azul indica la banda de exoPG.

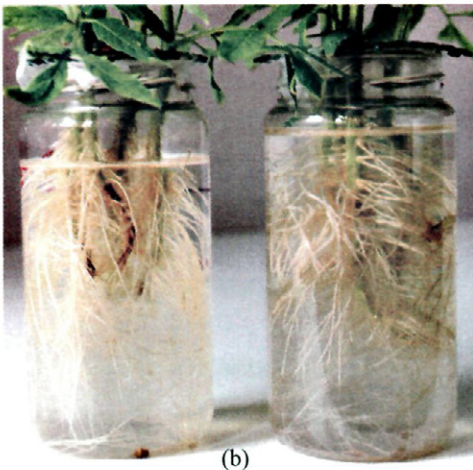
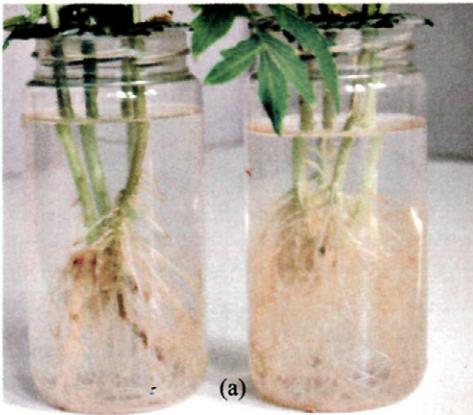


Fig. 2. - Raíces de tomate a los 21 días (a) y 28 días (b) de post-inoculación. Izquierda, raíces inoculadas y derecha, raíces control.

diente a la exoPG utilizada en este estudio detectó una banda de hibridación positiva (POSADA, 1999), lo que confirmaría la existencia de similitud entre la exoPG de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* y de tomate.

Para realizar un seguimiento de la expresión de esta enzima en los tejidos de tomate a lo largo de la infección, se realizaron experimentos con raíces de planta infectada y recogida en tres momentos diferentes del desarrollo de los síntomas de la enfermedad. A los 14 días post-inoculación los síntomas de infección son aún poco pronunciados incrementando progresivamente hasta los 28 días, en los que las manchas necróticas se extienden a lo largo de la raíz principal y cuello, afectando también a las raíces secundarias, esta necrosis se va incrementando y a los 28 días podemos observar toda la raíz y el cuello completamente necrosados (Fig. 2). Esta propagación de la necrosis es paralela a un aumento evidente en la expresión de la exoPG, como se pone de manifiesto en la Fig. 4.

## DISCUSIÓN

*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* produce *in vitro* una gran variedad de poligalacturonasas que podrían degradar parte de los polisacáridos presentes en la pared celular (FERNÁNDEZ, *et al.*, 1993). La mayoría de los estudios realizados hasta ahora se habían llevado a cabo con endopoligalacturonasas, pero los productos de degradación liberados por estas enzimas son oligómeros más grandes capaces de inducir los mecanismos de defensa de la planta (DE LORENZO, *et al.*, 1996) y además estas enzimas son reconocidas por las PGIPs (proteínas inhibidoras de las poligalacturonasas) (CERVONE, *et al.*, 1990). Sin embargo las exopoligalacturonasas producen monogalacturónico como producto final que no es una molécula activa en la inducción de los mecanismos de defensa de la planta y además las PGIPs las inhiben con menor intensidad (DE LORENZO, *et al.*, 1996).

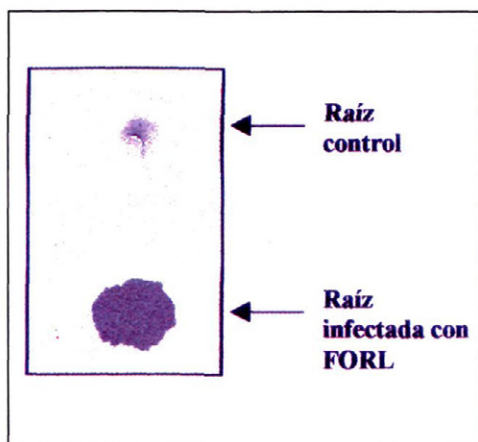


Fig. 3. - DT-IBA realizado con secciones transversales de raíz de tomate control y raíz de tomate infectada, ambas de 28 días.

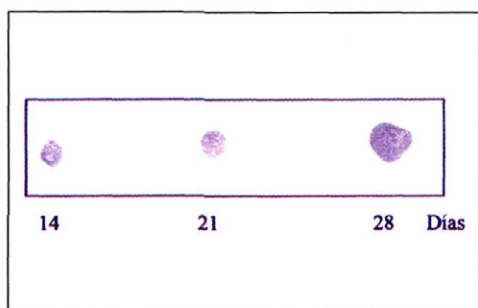


Fig. 4. - DT-IBA de raíces de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* en diferentes momentos de la infección (14, 21 y 28 días).

Por otro lado, los patrones de expresión de las poligalacturonas han sido estudiados en cultivos *in vitro* pero su expresión en planta no se conoce. En algunos casos se han observado diferencias notables en la expresión de enzimas en planta y las que aparecen *in vitro*. La importancia de las formas exoPG de la enzima a nivel de su expresión en planta ha sido confirmado recientemente en estudios realizados en bacterias (HUANG y ALLEN, 1997). La producción de una endoPG codificada por *peh A*, alcanza unos niveles elevados en el medio de cultivo, sin embargo, cuando los estudios se llevan a cabo en la planta esta forma de la enzima parece tener

un papel secundario en el desarrollo de la enfermedad y sin embargo, formas de la exoPG codificadas por *peh B* y *peh C* se ven incrementadas considerablemente en la planta. Al mismo tiempo que se observa que la mutación de *peh B* reduce notablemente la capacidad invasiva de la bacteria respecto a la cepa salvaje.

Además, la existencia de ejemplos como *Alternaria mali* incapaces de producir endoPG y que mantienen su virulencia puede indicar que las exoPGs podrían ser suficientes para iniciar la patogénesis (NOZAKI, *et al.*, 1997).

En nuestro trabajo estudiamos la presencia de una exoPG, mayoritaria en los cultivos *in vitro*, en plantas infectadas a diferentes tiempos de la infección, mediante la utilización de anticuerpos policlonales obtenidos frente a ella.

Utilizando estas herramientas, es decir, mediante inmunoensayos realizados con extractos de raíz de planta control y raíz de planta infectada y por métodos directos utilizando raíces de planta infectadas y control, pudimos observar que la exoPG se expresa en tejidos infectados y que los niveles de señal van aumentando paralelamente al desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Los síntomas externos de infección son poco pronunciados a los 14 días, aumentando progresivamente hasta los 28 días donde la podredumbre alcanza a todo el sistema radicular (Fig. 2).

La técnica DT-IBA es una técnica que está basada en la inmunodetección pero a diferencia de la electroforesis y posterior transferencia mediante western-blot, es más rápida y sencilla, presenta al mismo tiempo un inconveniente ya que no podemos controlar realmente la cantidad de proteína del ensayo y ello nos puede llevar a la aparición de alguna señal inespecífica. Esta técnica se había ensayado con éxito en la inmunodetección de una endopoligalacturonasa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plantas de tomate infectadas (ARIE, *et al.*, 1998). En nuestro caso hemos probado tanto a los 14 días como a tiempos superiores, cuando los síntomas de la podredumbre en la raíz y cuello de la planta son más patentes. Los resulta-

dos indican que la exoPG está presente en cantidades detectables en los tres tiempos y se observa una intensidad creciente a tiempos superiores (21 y 28 días) (Figs. 3 y 4). En estos experimentos se observa también una pequeña señal en planta control, posiblemente debida a la semejanza de las exoPGs de plantas y hongos. Existe una alta homología entre las poligalacturonasas de diferente origen a nivel molecular, que presentan bastantes secuencias conservadas, y en particular las exopoligalacturonasas de hongos y las poligalacturonasas de plantas (KESTER, *et al.*, 1996). Estos datos concuerdan con los obtenidos por ARIE, *et al.*, (1998), con endopoligalacturonasas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, ellos también detectan una pequeña señal en la planta control. Hay que tener en cuenta, como ya hemos comentado, que esta técnica no permite controlar la cantidad de proteína que estamos utilizando en el estudio, es decir, la concentración de proteínas es bastante superior a la que utilizamos

en las electroforesis para la posterior transferencia. Ésto hace que sea más probable la aparición de señales inespecíficas o la detección de otras PGs similares.

Estos estudios parecen hablar en favor de la implicación de las exopoligalacturonasas en la patogénesis provocada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. La disponibilidad de una librería genómica de FORL, de una sonda de la exopoligalacturonasa y mediante la interrupción del gen podremos en un futuro concretar su función y responsabilidad en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y así poder ejercer un control más directo sobre el desarrollo de la misma.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la DGICYT (PB96-0586) y B. Patiño por la Universidad Complutense (Programa de becas predoctorales).

## ABSTRACT

B. PATIÑO ÁLVAREZ, M. C. RODRÍGUEZ CÁMARA, T. RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, M. T. GONZÁLEZ JAÉN y C. VÁZQUEZ ESTÉVEZ, 1999: Inmunodetección de una exopoligalacturonasa en plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Bol San. Veg. Plagas*, **25** (4): 529-536.

In the present work we report the detection of the exopolygalacturonase enzyme in roots of infected tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL). Detection of exopolygalacturonase was performed by immuno-assays using policlonal antibodies against the purified exopolygalacturonase obtained from *in vitro* culture filtrates of FORL.

These assays confirm the exopolygalacturonase occurrence in infected plant tissues and increase of its expression level in correspondence with the enhancing of the root rot symptoms shown by the plant during the infection process.

**Key words:** Tomato, FORL, exopolygalacturonase, immunodetection.

## REFERENCIAS

- ALLEN, C.; SIMON, L.; ATKINSON, M. y SEQUEIRA, L., 1993: Analysis of polygalacturonase as a component of bacterial wilt disease. En: *Bacterial wilt*. G. L. Hartman y A. C. Hayward (Eds.) ACAIR Press, Canberra, Australis, pp. 238-244.
- ARIE, T.; HAYASHI, Y.; YONEYAMA, K.; NAGATANI, A.; FURUYA, M. y YAMAGUCHI, I., 1998: Detection of *Fusarium* spp in plant with monoclonal antibody. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **61**: 311-317.
- BATEMAN, D. F. y BASHAM, H. G., 1976: Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. En: *Encyclopedia of plant physiology*, New series, Vol:4, *Physiological plant pathology*. Heitefuss y Williams (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 316-355.
- BENHAMOU, N.; MAZAU, D.; GRENIER, J. y ESQUERRE-TUGAYE, M. T., 1991: Time-course of the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in root cells susceptible and resistant tomato plant infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Planta*. **184**: 196-202.
- BRADFORD, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- CAPRARI, C.; RICHTER, A.; BERGMAN, C.; LO CICERO, S.; SALVI, G.; CERVONE, F. y DE LORENZO, G., 1993: Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Mycol. Res.* **97**: 497-505.
- CERVONE, F.; DE LORENZO, G.; PRESSEY, R.; DARVILL, A. G. y ALBERSHEIM, P., 1990: Can *Phaseolus* PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants?: *Phytochemistry*. **29**: 447-449.
- COOPER, R. M., 1987: Use of mutants in exploring depolymerases determinants of pathogenicity. En: *Genetics and plant pathogenesis*. Day y Jellis (eds). Oxford, pp. 261-281.
- DE CAL, A.; PASCUAL, S. y MELGAREJO, P., 1997: Infectivity of chlamydospores vs microconidia of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* on tomato. *J. Phytopathol.* **145**: 231-233.
- DE LORENZO, G.; CASTORIA, R.; BELLICAMPI, D. y CERVONE, F., 1996: Fungal invasion enzymes and their inhibition. En *Mycota*. Carroll y Tudzinky (eds). Springer-Verlag. Berlin.
- DI PIETRO, A y RONCERO, M. C., 1998: Cloning, expression and role in pathogenicity of *pgl* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **11**: 91-98.
- FERNÁNDEZ, N.; PATIÑO, B. y VÁZQUEZ, C., 1993: Pectin degrading enzymes secreted by six isolates of *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* **97** (4): 461-466.
- HAHN, M.G.; BUCHELI, P.; CERVONE, F.; DOARES, S.H., O'NEILL, R.A.; DARVILL, A. y ALBERSHEIM, P., 1989: Roles of cell wall constituents in plant pathogen interactions. En: *Plant microbe interactions. Molecular genetics and perspectives*. Vol. 3. Kosuge y Nester (eds). McGraw Hill Publishing Co. New York, pp. 131-181.
- HUANG, Q. y ALLEN, C., 1997: An exo-poly- $\alpha$ -D-Galacturonidase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **179**: 7369-7378.
- JARVIS, W. R. y THORPÉ, H. J., 1976: Susceptibility of *Lycopersicon* species and hybrids to the foot and root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant. Dis. Rev.* **60**: 1027-1031.
- JARVIS, W. R. y SHOEMAKER, R. A., 1978: Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathol.* **68**: 1679-1680.
- JONES T. M., ANDERSON, A. J. & ALBERSHEIM, P., 1972: Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.*, **2**, 153-166.
- KESTER, H. C. M.; KUSTERS-VAN SOMEREN, M. A.; MÜLLER, Y. y VISSER, J., 1996: Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. *Eur. J. Biochem.* **240**: 738-746.
- LAEMMLI, M. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*. **227**: 680-685.
- NOZAKI, K.; MIYAIRI, K.; HOZUMI, S.; FUKUI, Y. y OKUNO, T., 1997: Novel exopolygalacturonase produced by *Alternaria mali*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (1): 75-80.
- PATIÑO, B.; POSADA, M. L.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; MARTÍNEZ DEL POZO, A. y VÁZQUEZ, C., 1997: Control of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 1084-1090.
- POSADA, M. L. (1999). Análisis genético, regulación y variabilidad de poligalacturonasas en el género *Fusarium*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- SÁNCHEZ, L. E.; ENDO, R. M. y LEARY J. V., 1975: A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* causing crown and root rot of tomato. *Phytopathol.* **65**: 726-727.
- VÁZQUEZ, C.; PATIÑO, B. y MARTÍNEZ, M. J., 1993: Purification and characterization of an exopolygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**: 191-196.
- WALTON, J. D., 1994: Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* **104**:1113-1118

(Recepción: 16 septiembre 1999)  
(Aceptación: 22 diciembre 1999)