

# Efecto Tóxico y Uso de Filtrados de *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*)<sup>1</sup>

C. A. Cordo\*, L. R. Marechal\*\*, F. J. Babinec\*\*\*

## ABSTRACT

To study the effect of *Mycosphaerella graminicola* filtrate upon wheat leaves and its possible usage as a resistance selection method, a liquid medium was used to culture the fungus; the culture filtrate was partially purified and two leaf bioassays were carried out to observe reproduction of the lesion on wheat leaves. The histological study was performed comparing the action of the inoculum and of the filtrate at cell level; its effect was focused upon the cell wall. Activity of hydrolytic enzymes (pectic and cellulolytic), their production by the pathogen, and their effect on wheat leaf blotch were detected. The activity was measured by reading viscometrical reduction and by detecting free reducing groups as reaction products. Pathogenic action of four *M. graminicola* strains was correlated with the toxic action of the strains' filtrate on three varieties of wheat. The fourth leaf of each variety was inoculated and filtrate applied to the leaves with polyurethane slides. Inoculum effect was measured through picnidial coverage. Filtrate effect was established by a scale of necrotic injury. Statistical analysis showed that inoculation and topical application were not correlated ( $r=0.192$ ) in regard to host-specific reaction. However, a general relationship was established between strain pathogenicity and filtrate aggressivity. Buck Napostá cultivar was the most sensitive wheat to fungus filtrate. It was concluded that a fungus filtrate with cellulolytic enzymes cannot be used for selecting resistant varieties.

**Key words:** *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*), wheat, enzymes, filtrate, selection method.

## COMPENDIO

Se estudió el efecto del filtrado de *Mycosphaerella graminicola* sobre hojas de trigo, con el objeto de emplearlo en el método de selección de cultivares resistentes. Para el crecimiento del hongo se utilizó un medio de cultivo líquido. El filtrado se purificó parcialmente. Para observar la reproducibilidad del síntoma en las hojas, se emplearon dos bioensayos. Se realizó un estudio histológico para comparar la acción del inóculo y del filtrado celular. El cultivo filtrado dañó las hojas cuando se inyectó y cuando se topicó. Su efecto se localizó sobre la pared celular. Se detectaron la actividad de enzimas hidrolíticas (pécticas y celulolíticas), su producción por el patógeno *in vitro* y su efecto sobre la hoja de trigo. Se midió la actividad enzimática mediante la lectura de la reducción de la viscosidad y por detección de grupos reductores libres, como productos de reacción. Se determinó el carácter constitutivo de las enzimas celulolíticas y el adaptativo de las pécticas. Se correlacionó la acción patogénica de cuatro aislamientos de *M. graminicola* con la acción tóxica del filtrado de los aislamientos sobre tres cultivares de trigo. El análisis estadístico mostró que la inoculación y la topicación no se correlacionaron en cuanto a su reacción específica para cada variedad. Sin embargo, se estableció una relación entre patogenicidad de los aislamientos y agresividad de los filtrados fúngicos. Se concluyó que un filtrado fúngico con enzimas celulolíticas no puede ser usado para seleccionar cultivares resistentes.

**Palabras claves:** *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*), trigo, enzimas, filtrados, método de selección.

## INTRODUCCION

La "mancha de la hoja del trigo" causada por *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter Rob. ex Desm. produce necrosis en las partes aéreas de la planta (30), ocasionando pérdidas considerables en caso de epifitias severas (13).

Como en otras enfermedades, el método de control más eficiente es la selección de cultivares resistentes mediante infecciones naturales o inoculaciones artificiales. Se han empleado las toxinas producidas por los patógenos respectivos en lugar del inóculo, para la búsqueda de fuentes de resistencia, como en el caso de la caña de azúcar, contra *Helminthosporium sacchari* (26), y del maíz, contra *H. carbonum*, (16), o para detectar la sensibilidad del hospedante al patógeno, como en el caso de la avena frente a *H. victoriae* (17),

1 Recibido para publicación el 1 de noviembre de 1989. Los autores agradecen a las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" por haber facilitado el lugar de trabajo, materiales y drogas para esta investigación; a Juan C. Lindquist, por la lectura crítica y opiniones vertidas; a Carlos del Santo, por el asesoramiento estadístico; a las autoridades de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), Buenos Aires, por el financiamiento de esta investigación; a Héctor O. Arriaga, su asesoramiento como Codirector, y a Héctor E. Alippi, por haber permitido el uso de las instalaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Plata, Arg.

\* Investigador Adjunto de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de La Plata.

\*\* Investigador del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", Buenos Aires, Arg.

\*\*\* Secretaría de Investigaciones Científicas, Lomas de Zamora, Buenos Aires, Arg.

del sorgo frente a *Periconia circinata* (23); de la cebada, ante *H sativum* (14), o del álamo, ante *Ceratocystis ulmi* (22).

El conocimiento sobre la toxina de *S. tritici* es limitado. Malcom (18) describió un glucopéptido específico, con actividad enzimática celulolítica. Cordo y Marechal (11) establecieron la participación de enzimas celulolíticas como responsables del síntoma de la enfermedad; lo hicieron a través del estudio histológico y de reacciones comparativas con otras celulasas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la posibilidad de emplear el filtrado de *M. graminicola* (Fuckel) Schroeter en la selección de genótipos resistentes. Se analizó la actividad enzimática, se investigaron técnicas de aplicación y se compararon los resultados obtenidos mediante la aplicación del filtrado y del inóculo sobre cultivares de trigo.

#### MATERIALES Y METODOS

Los filtrados empleados en este trabajo fueron obtenidos por crecimiento de cuatro aislamientos del hongo (38388C.D.L.HW3, LHW4 LHW5) en medio Fries núm. 3 con extracto de levadura (6). Se centrifugaron a 12 000 g, durante 15 min y los supernadantes se liofilizaron. Se redisolviéron en agua destilada en un volumen de 18 a 20 veces menor que el original y se desalinizaron con una columna de Bio Gel P6, Bio Rad Laboratorios (50-100 mesh), equilibrada y eluida con agua; la velocidad de flujo fue de 10 ml por minuto. Se midió el contenido de azúcares (prueba fenolsulfúrica) y de proteínas por lectura de absorbencia a 235 nm y con el reactivo de Bradford (7).

Se probaron dos bioensayos foliares: 1) Inyección del filtrado purificado en hoja joven (26) y 2) topicación del filtrado purificado en hoja joven (16).

Se analizó histológicamente el daño ocasionado por el filtrado en el tejido de la hoja. La composición química del filtrado se determinó mediante reacciones específicas para celulasas, poligalacturonasas (4) y pectinpectato liasas (3).

La actividad enzimática se detectó al considerar el porcentaje de reducción de la viscosidad de la mezcla de reacción (12) y el incremento en grupos reductores por el Método Somoggi-Nelson (24). Los aislamientos empleados (38388C.D. y LHW5) se cultivaron en el medio Fries núm. 3 con extracto de levadura, empleando inductores para la producción de celulasas y poligalacturonasa: carboximetil celulosa y pectinas de manzana (ambas al 1%), respectivamente.

La actividad de la poligalacturonasa (PG) se estudió al medir la reducción de la viscosidad de una solución del 2% de pectina de manzana como sustrato, con un viscosímetro Fenske-Ostwald 150. La mezcla de reacción contenía 2.5 ml de pectina al 2%; 0.1 ml de 0.5 M "buffer" citrato al pH 4.8; 2 ml de extracto, llevando a 8 ml con agua destilada. Se emplearon dos testigos:

T1 = mezcla de reacción sin filtrado enzimático.  
T2 = agua destilada.

La actividad de la celulasa se estudió al medir la reducción de la viscosidad de una solución al 2% de carboximetil celulosa sódica (CMC) como sustrato. El viscosímetro utilizado fue F.O. tipo 300. La mezcla de reacción contenía 2.5 ml de CMC al 2% a pH 4.3, 0.1 ml de 0.5 M de "buffer" citrato a pH 4.8 y 2 ml de extracto, en un volumen final de 8 mililitros. Se emplearon dos testigos:

T1 = mezcla de reacción sin filtrado enzimático.  
T2 = agua destilada.

La lectura de azúcares reductores se hizo en un fotolorímetro Coleman a 520 nanómetros. La incubación de la reacción se hizo durante 240 minutos a 35 grados centígrados. Todos los ensayos se repitieron dos veces y cada repetición se realizó por duplicado. Los resultados se expresaron con una significancia de P0.05.

Para comparar los resultados obtenidos, entre la topicación con filtrado y la inoculación artificial con suspensión de esporas, se condujeron ensayos con los cuatro aislamientos anteriormente indicados y tres cultivares nacionales: Trigo 708 (T 708), Buck Napostá (BN) y Klein Toledo (KT), en un factorial 4 x 3 según un diseño completamente aleatorizado con tres (topicado) y cuatro (inoculado) repeticiones, respectivamente.

Para el topicado, en cada unidad experimental (parcela), 10 hojitas fueron limpiadas previamente con agua destilada estéril, sobre las que se colocaron cubos de poliuretano de 4 mm de lado, sobresaturados con filtrado. Las hojas topicadas se cubrieron con tapas de vidrio y el sistema quedó en cámara húmeda durante 96 horas. Al finalizar el período, se retiraron los cubos y se observó el daño producido. La sensibilidad de la hoja se clasificó en cuatro niveles (0 = ausencia; 1 = ampollado epidérmico; 2 = menos del 50% del ancho de la lámina necrosada; y 3 = más del 50% del ancho de la lámina necrosada).

Para el análisis de la variancia se calculó el daño en promedio para cada unidad experimental: suma de las

frecuencias multiplicadas por los valores respectivos. Se probó el ajuste de las observaciones a una distribución normal por Kolmogorov-Smirnov (25).

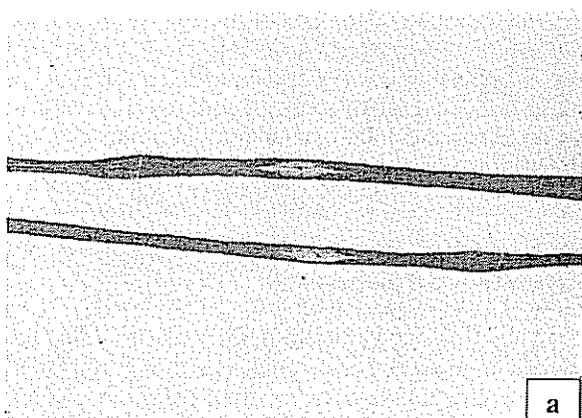
La inoculación se realizó por medio de la técnica descrita por Cordo (10): se preparó el inóculo con aislamientos cultivados en medio Fries núm. 3 con extracto de levadura. La concentración de esporas se ajustó a  $3.5 \times 10^6$ . Cada unidad experimental consistió en una maceta con cinco plantas. Para el análisis del porcentaje de cobertura pecnidial promedio se usó la transformación angular.

### RESULTADOS

En el filtrado desalinizado se detectaron azúcares (150  $\mu\text{mol/ml}$  de filtrado) y proteínas (2.5  $\text{mg/ml}$  de filtrado).

#### Técnica de aplicación del filtrado

La inyección produjo una lesión necrótica similar a la producida por el hongo, de contorno difuso, con cicatriz del pinchazo, centro necrótico definido y halo de epidermis blanqueada, paralelo a las nervaduras. Cuando se aplicó diluido (1:1) sólo se produjo un halo clorótico. La infiltración con medio de cultivo purificado y con agua destilada (testigos) no produjo reacción. Con esta técnica el síntoma apareció en 48 h (Fig. 1a).



La topicación del filtrado produjo adelgazamiento y dilatación del ancho de la lámina con necrosis de la zona también topicada. Como tipos extremos de lesión se pudo observar, desde el ampollado epidérmico con desorganización celular, hasta la hendidura de la epidermis en casos más agudos, que comprometió a ambas epidermis.

El síntoma se manifestó entre el cuarto y quinto días (Fig. 1b). El tipo de lesión, producido por topicación, condujo a investigar la acción de enzimas participantes en el colapso de la pared celular. Mediante el estudio histológico se determinó que el espesor de la lámina foliar se redujo a la mitad, y las paredes de las células parenquimáticas se destruyeron, con desaparición del contenido, mientras que el haz vascular se mantuvo intacto (Fig. 2ab). Estos caracteres resaltan al compararlos con tejido sano (Fig. 2c). Estas observaciones hacen suponer que el filtrado parcialmente purificado actuó sobre elementos cementantes y la propia pared; y se presupone que las enzimas celulolíticas y pectolíticas participaron en el proceso inicial de patogénesis.

#### Actividad enzimática

La actividad de la poligalacturonasa se destacó cuando el aislamiento 38388C.D. creció bajo inducción pectina de manzana. Produjo 121.7  $\text{Mmol}$  glucosa reductora/ $\text{mg}$  proteína a los 240 min, reduciéndose en un 83% la viscosidad del sustrato. En cambio, el mismo aislamiento sin inductor redujo un 3% la vis-

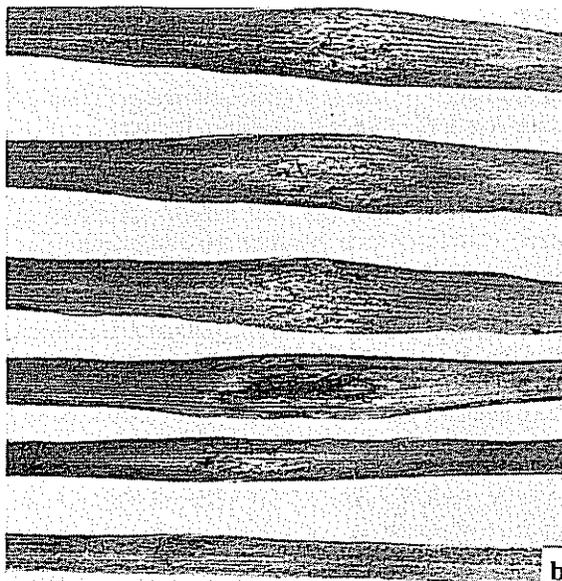


Fig. 1. Lesión producida por a) inyección del filtrado parcialmente purificado de *M. graminicola* (aumento de  $\times 1$ ); por b) topicación del filtrado parcialmente purificado de *M. graminicola* (aumento de  $\times 1$ )

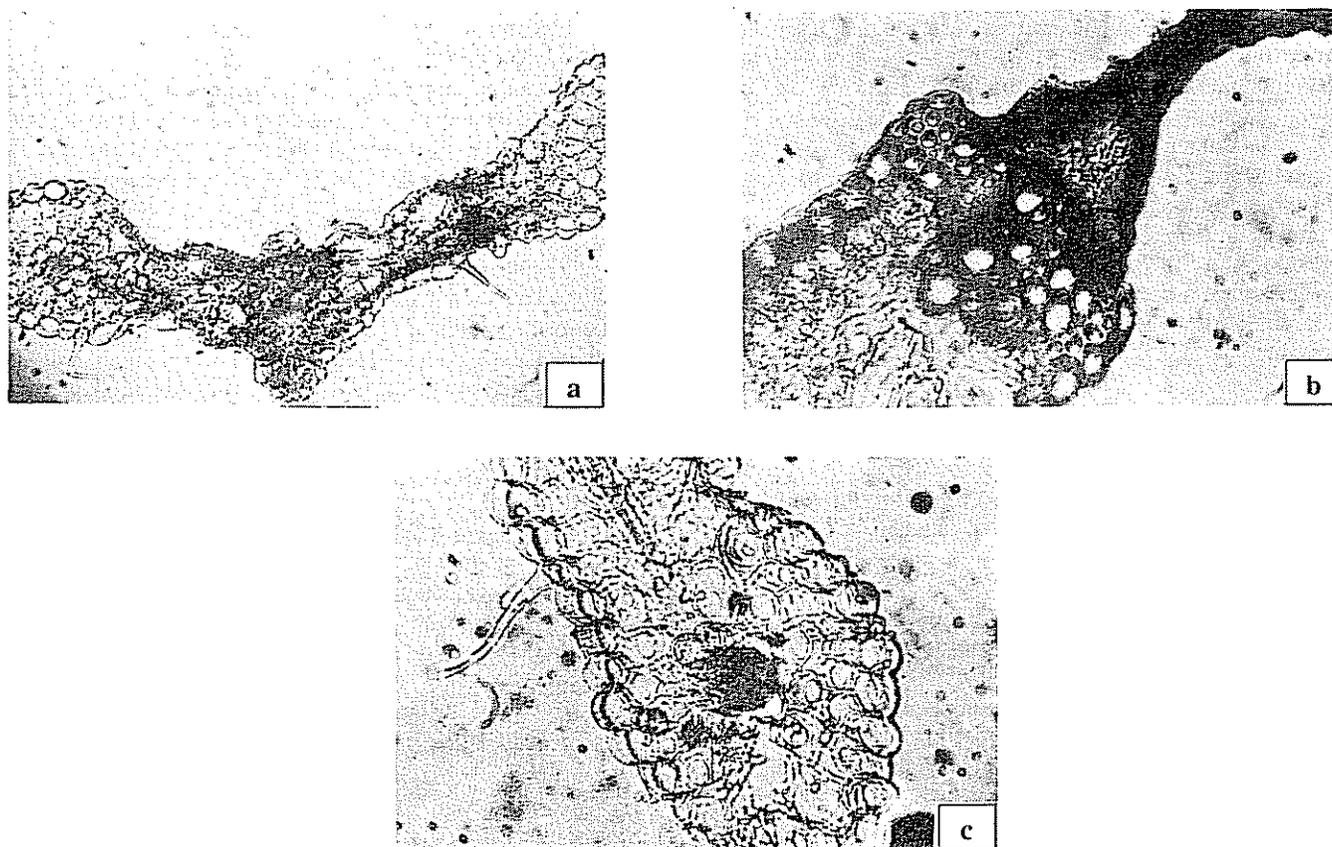


Fig. 2. Corte transversal de la hoja de trigo, a) inyectada con filtrado de cultivo de *M. graminicola* (obsérvese la reducción del espesor de la lámina en la zona afectada; aumento de x210); b) infectada por *M. graminicola* (obsérvese la reducción del espesor de la lámina en la zona afectada); c) comparación con el tejido normal (aumento de x280).

cosidad, produciendo 3.43 Mmol glucosa reductora por miligramo de proteína a 240 minutos. Ninguno de los testigos acusó pérdida de viscosidad ni eliminación de grupos reductores. Este resultado confirmaría la naturaleza inductiva de la poligalacturonasa producida en cultivo por *M. graminicola* (Figs. 3a y 3b).

La actividad de la celulasa se evidenció por la reducción de la viscosidad del sustrato cuando se ensayó con filtrado producido sin inducción. La reducción en la viscosidad del sustrato para el aislamiento 38388C.D. se vio casi triplicada al finalizar la cuarta hora de reacción (33%), comparado con la reducción de la viscosidad medida para el aislamiento LHW5 (13%). Cuando el aislamiento 38388C.D. creció, sujeto a inducción con CMC, la reducción en viscosidad aumentó a un 84% en la cuarta hora. Los valores elevados de reducción en la viscosidad del sustrato, evidenciados en los aislamientos no inducidos, sugerirían la naturaleza constitutiva de la celulasa (Fig. 3c).

Contrariamente a lo acaecido con la mezcla de reacción completa, los controles (T1 y T2) no manifes-

taron reducción de la viscosidad ni liberación de azúcares reductores en el transcurso de la cuarta hora de observación. El tipo de celulasa producido por *M. graminicola*, no fue detectada por Somoggi-Nelson al menos con 240 min de incubación.

La naturaleza inductiva de la poligalacturonasa (un incremento) del 89% en la reducción de la viscosidad y de más de 100 veces en los moles de glucosa reductora por miligramo de proteína, eliminados al cabo de la cuarta hora de reacción, indicaría que los constituyentes de la pared celular estimularían la producción de enzimas.

#### Efecto del filtrado versus efecto del inóculo

El análisis de ambos efectos muestra falta de correlación entre los dos métodos de evaluación de la reacción de los cultivares frente al patógeno. En el Cuadro I se observa que el cuadrado medio para inoculación fue altamente significativo para las fuentes de variación: tratamientos, aislamientos y para la

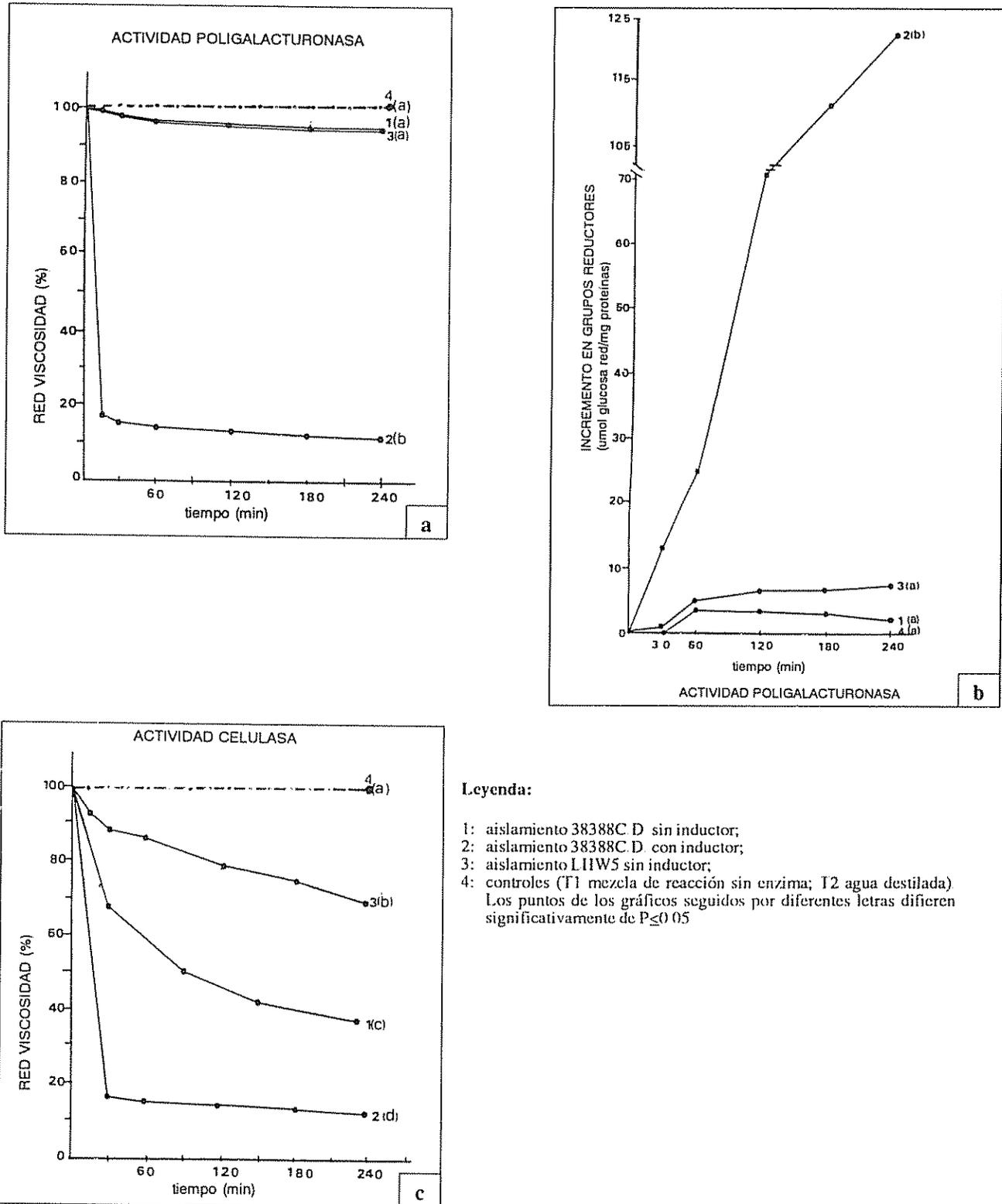


Fig. 3. a y b) Actividad de poligalacturonasa; porcentaje de reducción de viscosidad de la mezcla de reacción y actividad enzimática por medio del incremento en grupos reductores por el método de Somoggi-Nelson. Mediciones realizadas durante 240 min; 3c) actividad de celulasa; porcentaje de reducción en viscosidad de la mezcla de reacción durante 240 minutos

interacción aislamiento por cultivar. Esto último indicaría cierto grado de especialización para los aislamientos LHW4 y LHW5, cuyos porcentajes de cobertura picnidial son intermedios entre los otros dos aislamientos (Cuadro 2). Los cultivares utilizados mostraron diferencias significativas y altamente significativas respectivamente, con estas cepas.

**Cuadro 1. Análisis de la variancia para inoculación (CM<sub>1</sub>) y topicación (CM<sub>2</sub>).**

Fuente de variación	G.L.	CM <sub>1</sub>	Humedad
Tratamientos	11	0.330 302**	1.805 258**
Cepas	3	0.809 977**	3.666 962**
Variedades	2	0.044.119**	2.008.992**
Cepa x variedad	6	0.115 859**	0.806 494*
Variancia en LH <sub>3</sub>	2	0.224 791**	0.639 186**
Variancia en LH <sub>4</sub>	2	0.176 575*	0.173 334**
Variancia en LH <sub>5</sub>	2	0.108 781**	0.501.511**
Variancia en 38388C.D.	2	0.089 673**	3.114 445**
Error	36	0.29343	—
	23		0.263 643
Coefficiente de variabilidad (%)		20.12	38.42

Notas:

n.s. no significativo.

Para la técnica de topicación, la variación se concentró en el aislamiento 38388C.D. de mayor virulencia. En este caso la interacción significativa no es necesariamente un indicador de especialización. El coeficiente de variación es considerablemente superior al obtenido para inoculación. Este dato alertaría sobre la reducida precisión de la técnica de topicación. Los resultados obtenidos con la variable índice medio de daño –para topicación– muestra además escasa concordancia con los obtenidos para cobertura picnidial (Cuadro 3). La correlación entre ambos no fue sig-

**Cuadro 2. Comportamiento promedio de las cepas**

	Cobertura picnidial (%) (inoculación)	Daño promedio (topicación)
LH <sub>3</sub>	7.6 a	0.46b
LH <sub>4</sub>	13.0ab	1.83a
LH <sub>5</sub>	23.6bc	1.79a
38388 C.D.	28.2c	1.25ab

Notas: Cepas con la misma letra no difieren significativamente al 1% (Prueba de Student).

nificativa ( $r = 0.192$ ). La topicación con filtrado fúngico de composición celulolítica no es eficaz para detectar el comportamiento de cultivares frente a *S. tritici* (Figs. 4 y 5). La observación de la Fig. 5 realza la sensibilidad de cada cultivar frente al filtrado fúngico y su correspondencia con la acción del inóculo.

La reacción de los tres cultivares se correlacionó con la aplicación del inóculo y la topicación del filtrado, sólo para el aislamiento menos virulento (LHW5). Para los restantes aislamientos se observó una reacción heterogénea y no correlativa por la aplicación de los dos tratamientos. Así para el aislamiento LHW3, la topicación produjo una reacción de intermedio en los tres cultivares, mientras que con la inoculación se registraron los tres tipos de reacción.

También se pudo detectar, mediante gráficos, el grado de virulencia de los aislamientos y su correspondencia con la sensibilidad de la variedad a la acción del filtrado (Fig. 4). El aislamiento LHW5 se caracterizó por su bajo grado de virulencia. Su filtrado ocasionó una respuesta insensible en T 708 y KT; en cambio, moderadamente sensible en BN (tipo 2). Esta diferencia no fue detectada estadísticamente. La virulencia de ninguno de los restantes aislamientos se reflejó en la sensibilidad de los correspondientes cultivares a la acción de los respectivos filtrados. Los aislamientos LHW4 y 38388C.C. demostraron comportamientos

**Cuadro 3. Correlación entre técnicas de inoculación y topicación.**

Cepa Variedad	LH <sup>3</sup>			LH <sub>4</sub>			LH <sub>5</sub>			38388 C.D.		
	BN	KT	T708	BN	KT	T708	BN	KT	T708	BN	KT	T708
Inoculación	34.98 <sup>1-2</sup>	22.21 <sup>b</sup>	14.99 <sup>b</sup>	11.38 <sup>a</sup>	6.63 <sup>a</sup>	20.44 <sup>b</sup>	3.48	8.73	11.65	20.79	31.23	32.95
Topicación	1.17 <sup>3</sup>	1.40	0.77	1.63	1.77	2.50	0.13	0.92	0.33	0.73 <sup>a</sup>	2.77 <sup>c</sup>	1.87 <sup>b</sup>

Notas:

- 1 Variedades con igual letra no difieren significativamente (dentro de cada cepa); ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas.
- 2 Promedio general del porcentaje de cobertura picnidial.
- 3 Índice medio de daño.

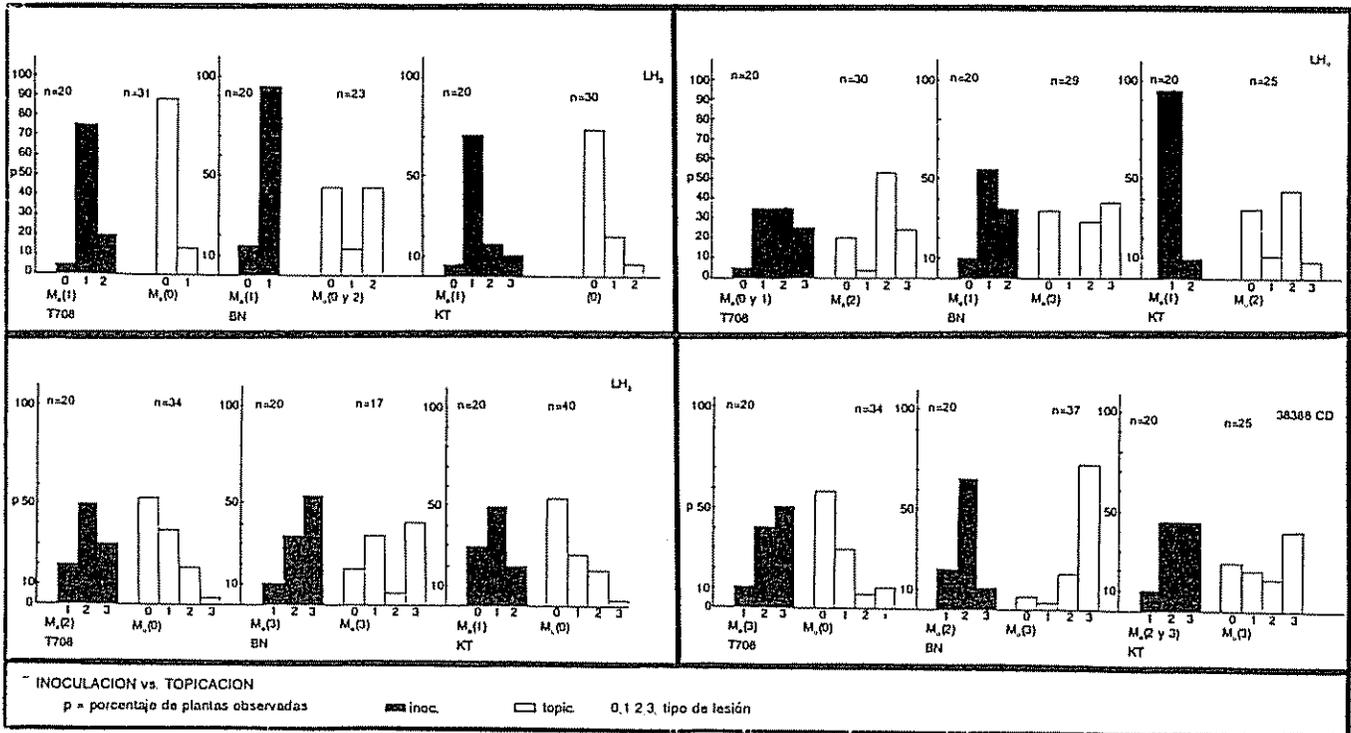


Fig. 4. Frecuencia de daño inóculo *versus* daño filtrado sobre tres cultivares de trigo (Trigal 708, Buck Napostá, Klein Toledo) para los aislamientos LH5, LHW4, 38388C.D., LHW3.

**Leyenda:** Barras de posición derecha: Frecuencia observada según escala-tipo de lesión filtrado.  
 Barras de posición izquierda: Frecuencias observadas según escala-tipo de lesión inóculo

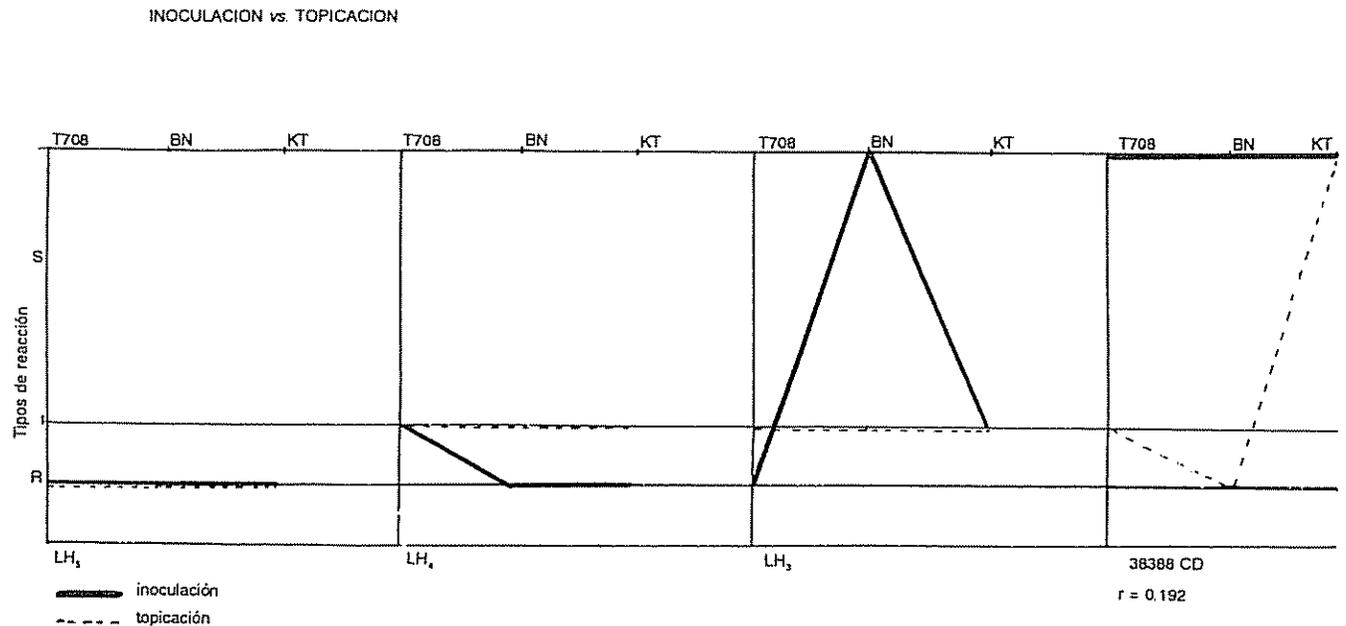


Fig. 5. Correspondencia entre acción del inóculo y del filtrado de los tres cultivares para cada uno de los aislamientos (LHW5, LHW4, LHW3, 38388C.D.).

opuestos; en cambio, LHW3 demostró un comportamiento desplazado.

### DISCUSION

Las celulasas son muy significativas en enfermedades en que el patógeno se mueve en forma relativamente lenta, a través del tejido hospedante (podredumbres secas, mancha de hoja); hay una lenta pero completa degradación del tejido por el patógeno primario (32). Cordo y Marechal (11) establecieron la responsabilidad de las enzimas celulolíticas en la producción del síntoma de la "mancha de la hoja del trigo". Lo evidenciaron por medio de estudios histológicos y de reacciones comparativas con otras celulasas. Malcom (18) citó por primera vez la actividad de enzimas celulolíticas al describir el síntoma desarrollado, por inyección del filtrado fúngico sobre dos cultivares de trigo de distinta susceptibilidad a *S. tritici*. El rasgo determinante fue el debilitamiento de la rigidez estructural con daño y muerte aparente del contenido celular. Este carácter también se observó en el estudio histológico de este trabajo. La muerte celular, con desaparición de contenido y destrucción de paredes, se visualizó en el corte transversal de hoja de trigo inyectada con filtrado.

Malcom (18) también describió que los dos cultivares inyectados reaccionaron con distinta sintomatología: sólo clorosis, o clorosis y necrosis, según que el cultivar fuese resistente o susceptible, respectivamente. Sin embargo, en este trabajo, los dos cultivares nacionales de distinta susceptibilidad respondieron de forma similar.

El estudio histológico constituyó una herramienta valiosa para interpretar el daño celular producido por un mecanismo que guía la desorganización del mesófilo. El desarrollo intercelular de *M. graminicola* recuerda al desarrollo de otros patógenos, como *Rhizoctonia* en hipocótilos de *P. vulgaris* (4), en que la laminilla media de las células corticales del hipocótilo se disuelven y los espacios intercelulares están empaquetados con hifas fúngicas.

El desarrollo intercelular de hifas fúngicas de *M. graminicola* implicaría la participación de un complejo enzimático hidrolítico —enzimas pécticas y celulolíticas— donde el principio macerante, representado por poligalacturonasa y polimetilsteearasas, sería responsable de la digestión del cementerio intercelular o la laminilla media. Otro rasgo que determina la acción enzimática es el tiempo que transcurre en la aparición de síntomas. El filtrado inyectado produjo su acción en 48 h, y en contacto con cutícula en cuatro días. Esto fue observado también por Brown (8).

La heterogeneidad entre los tipos de reacción, para un mismo cultivar no está bien entendido aún. La composición polisacarida (celulosas, pectinas) de paredes celulares de plantas maduras, para distintas variedades en una misma especie, es esencialmente idéntica (1), como también lo son los constituyentes de paredes celulares de monocotiledóneas y dicotiledóneas (2, 9). Habiendo eliminado las posibles causas de variabilidad experimental, sólo resta pensar en factores relacionados con la reacción enzimática: disponibilidad del sustrato, estabilidad de enzima, velocidad de la reacción.

Tomiyama (28), Griffey y Leach (15) y Mercer *et al.* (20) establecieron que el espesor de material de pared celular afecta la habilidad del patógeno y de la enzima para degradarla. Las paredes gruesas son más duras y requieren más tiempo en ser degradadas. Esto explicaría que, en muchas enfermedades, las partes más viejas de la planta son las más resistentes. No obstante, las celulasas, poligalacturonasas y otras enzimas que degradan paredes celulares varían cualitativamente como isoenzimas. Presumiblemente hay una intensa variación isoenzimática de las enzimas degradantes, pero también hay variación en sus productos, siendo ésta casi siempre cuantitativa (2). Esta variación de las enzimas y sus productos podrían orientar las causas de heterogeneidad observadas en este trabajo.

La acción enzimática del filtrado observada en hojas de trigo, es localizada. Sólo reacciona la superficie de contacto, tanto al picar como al inyectar. En cambio, es sistémica para otros metabolitos tóxicos producidos por *H. sacchari* (26), *H. carbonum* (16); *H. victoriae* (19); *A. kikuchiana* (27). Por la investigación bibliográfica (23, 31, 33) se conoce que una toxina podría emplearse en pruebas de resistencia varietal si está casualmente involucrada en la producción de la enfermedad-factor de patogenicidad. Otra categoría de toxina, a la que se conferiría un nivel medio de resistencia, es la que está comprometida en el inicio de la enfermedad, pero la reacción del hospedante varía según la concentración que se aplique (factor de virulencia) (29).

Algunos autores consideran a las enzimas extracelulares —enzimas degradantes de la pared celular— como indirectamente toxinas a las células vegetales, o les atribuyen sólo carácter tóxico a las enzimas pécticas (5). Para este caso, las enzimas celulolíticas no serían consideradas toxinas. Varios caracteres reafirmarían esta observación: acción localizada, efecto no observado a distancia del lugar de producción, reacción producida después de un período prolongado de contacto de la mezcla —cuarto día— lo que indica la intervención de una enzima (8). A partir de este análisis, no se puede emplear una enzima para selec-

cionar fuentes de resistencia, porque como tal no actúa como factor de patogenicidad ni de virulencia.

En los gráficos de interacción/filtrado-cultivar y en el análisis de la producción de la enfermedad por cada aislamiento en particular, se observó falta de correspondencia entre el efecto del inóculo y efecto del filtrado para los cuatro aislamientos interactuantes. Alberseim, Jones y English (1) formularon una explicación de la causa que distintos aislamientos de un mismo patógeno ataquen diferencialmente cultivares diferentes de una misma especie. El espectro de interacción entre enzimas que degradan los polisacáridos de pared y los carbohidratos de la planta hospedante es muy amplio, y conduce a una variedad de interacciones entre planta y la enfermedad; en cambio, se establece una relación más o menos razonable entre producción de la toxina y producción de la enfermedad por el patógeno (33). Esta parcialización podría apoyar la consideración de metabolito no tóxico -en sentido estricto- para las enzimas celulolíticas tratadas en este trabajo.

#### CONCLUSIONES

Siguiendo las consignas delineadas al señalar el propósito de este trabajo se concluye que no se halló correlación de resultados al comparar el efecto del método de **inoculación** con el efecto del método de **topicación**. Con ambos métodos se observa una respuesta definida de cada uno de los cultivares (BN, KT, T708) a los respectivos aislamientos (LHW5, LHW4, LHW3, 38388C.D) pero al compararlas no se corresponden. Por tanto, el filtrado de cultivo de *M. graminicola* de composición enzimática (celulasas) no se puede emplear en la selección para comportamiento varietal.

#### LITERATURA CITADA

- 1 ALBERSHEIM, P.; JONES, I.; ENGLISH, P. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation of infective processes. Annual Review of Phytopathology 7:171-195.
- 2 ALBERSHEIM, P.; ANDERSON-PROUTY. 1975. Carbohydrates, protein, cell surface, and the biochemistry of pathogenesis. Annual Review of Plant Physiology 26:31-52.
- 3 BASHIAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. 1985. Detection of cutinase and pectic enzymes during infection of tomatoes by *Pseudomonas syringae*. Phytopathology 75:940-945.
- 4 BATEMAN, D.F. 1963. Pectolytic activities of culture filtrates of *Rhizoctonia solani* and extracts of *Rhizoctonia*-infected tissues of bean. Phytopathology 53:198-204.
- 5 BATEMAN, D.F.; BASHIAN, Y. 1976. Degradation of plant cells and membranes by microbial enzymes. In Physiological plant pathology Encyclopedia of Plant Physiology 4:316-345.
- 6 BOUSQUET, J.F.; SKAJJENNICOV, M.S. 1974. Isolation and mode of action of a phytotoxin produced by *S. nodorum* Berk. Phytopathology 80:355-360.
- 7 BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- 8 BROWN, W. 1915. The action of *Botrytis cinerea*. Annals of Botany 29:313-348.
- 9 BURQUE, D.; KAUFMAN, P.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. 1974. The structure of plant cell walls. VI. A survey of walls of suspension-cultured monocots. Plant Physiology 54:109-115.
- 10 CORDO, C.A. 1979. Mancha de la hoja del trigo (*Septoria tritici*) en la República Argentina: Método de inoculación en laboratorio. Anales de la Sociedad Científica Argentina 212:41-48.
- 11 CORDO, C.A.; MARECHIAL, I.R. 1988. Acción tóxica del filtrado de *Septoria tritici*. Revista de la Facultad de Agronomía (Arg.) 63:25-34.
- 12 DESHPANDE, K.B. 1960. Studies on the pectolytic enzymes system of *Rhizoctonia solani* Kuhn. IV. Viscosity-reducing enzymes. Enzymology 22(5):295-306.
- 13 EYAL, Z.; AMIRI, Z.; WAHL, I. 1973. Physiological specialization of *S. tritici*. Phytopathology 63:1087-1091.
- 14 GAYED, S.K. 1961. Production of symptoms of barley leaf-spot diseases by culture filtrate of *Helminthosporium sativum*. Nature 12:725-726.
- 15 GRIFFEY, R.T.; LEACH, J.G. 1965. The influence of age of tissue on the development of bean anthracnose lesions. Phytopathology 55:915-918.
- 16 HOFFMAN, S.J.; SCHIILE, J. 1972. Leaf bioassay for *Helminthosporium carbonum* toxin: Search for phytoalexin. Phytopathology 63:729-734.
- 17 LUKE, H.; WHEELER, H.E. 1955. Toxin production by *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology 45:453-458.
- 18 MALCOM, H. 1978. A host-specific toxin extracted from *Septoria tritici*. In Proceedings of the Australian Septoria Workshop. N.S.W. Wales.
- 19 MEEHAN, F.; MURPHY, H. 1974. Differential phytotoxicity of metabolic by-products of *Helminthosporium victoriae*. Science 106:270-271.
- 20 MERCER, P.C.; WOOD, R.K.S.; GREENWOOD, A.D. 1974. Resistance to anthracnose of French bean. Physiological Plant Pathology 4:291-306.
- 21 NELSON, N. 1944. A photometric-adaptation of the Somoggi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry 153:375-380.

22. SALEMINK, C.A.; REBEL, H. 1965. Phytotoxin isolated from liquid cultures of *Ceratocystis ulmi*. Science 149:202-203.
23. SCHEFFER, R.P.; PRINGLE, R.B. 1961. A selective toxin produced by *Periconia circinata*. Nature 191:912-913.
24. SCHEFFER, R.P.; YODER, O.C. 1972. Host-specific toxins and selective toxicity. In Phytotoxins in plant disease. R.K.S. Wood, A. Ballio, A. Graniti (Eds.). New York, Academic. p 251-272.
25. STEEL, R.D.Y.; TORRIE, J.H. 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. McGraw-Hill. 622 p.
26. STEINER, G.; BYIHNER, R. 1971. Partial characterization and use of a host specific toxin from *H. sacchari* on sugarcane. Phytopathology 61:691-695.
27. TANAKA, S. 1933. Studies on black spot diseases of the Japanese pear (*Pyrus serotina*). Memoirs of the College of Agriculture. Kyoto University 28:1-31.
28. TOMIYAMA, K. 1963. Physiology and biochemistry of disease resistance of plants. Annual Review of Phytopathology 1:295-324.
29. VANDER PLANK, J.E. 1978. Genetics and molecular basis of plant pathology. New York, Springer-Verlag. 167 p.
30. WEBER, G.F. 1922. Speckled leaf blotch of wheat. Phytopathology 12:558-585.
31. WHEELER, H. 1975. Plant pathogenesis. New York, Springer-Verlag. 106 p.
32. WOOD R.K.S. 1960. Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease. Annual Review of Plant Physiology 11:229-322.
33. YODER, O.C. 1981. Assay. In Toxins in plant disease. R.D. Durbin (Ed.). New York, Academic Press. p 45-78.

## RESEÑA DE LIBROS

**FAGERIA, N.K.; BALIGAR, U.C.; JONES, C.A. 1991. Growth and mineral nutrition of field crops. Nueva York, Deckker. 476 p.**

En la línea de la serie de libros sobre suelos, plantas y ambiente, este volumen examina, en sus primeros seis capítulos, la nutrición mineral de los cultivos agronómicos; los factores que afectan ese proceso, especialmente ambientales; el flujo de nutrimentos que permiten identificar los problemas nutricios; las técnicas de simulación de manejo y crecimiento de cultivos; y, finalmente, las interacciones entre nutrimentos esenciales y enfermedades de las plantas.

En adición a la reciente información en este campo, se amplían las consideraciones sobre el ambiente tropical, en vista de la amplia experiencia de los dos primeros autores sobre el tema. El énfasis bibliográfico en los artículos está dado porque constituyen un resumen de la información existente, y que, a pesar de no ser los más actualizados, dan una visión amplia de la problemática. La bibliografía del segundo capítulo, concerniente a las influencias ambientales, es particularmente amplia—más de cien referencias.

Los once capítulos siguientes están dedicados a los cultivos o a grupos de ellos. Se inicia con el tratamiento de los cereales, trigo y cebada, arroz, maíz y sorgo; luego, se sigue con las leguminosas, soja, frijol y caupí y maní, caña de azúcar, yuca y algodón. En el último capítulo se examina la nutrición de pastos con énfasis especial en las mezclas gramíneo-leguminosas y en la fijación potencial de nitrógeno por parte de los componentes de leguminosas en pastos. Todos los textos son claros y comprensibles para el profesional o el agricultor, con educación informal. El inglés es diáfano y permite el estudio del tema con conocimientos moderados.

En general es una obra de referencia de considerable utilidad para bibliotecas e investigadores, a quienes se recomienda su lectura.

ELEMER BORNEMISZA  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA