

Expressão diferencial de PGIPs em feijoeiro durante a infecção de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Marília Barros Oliveira¹; Lucas Breseguelo do Nascimento¹; Murillo Lobo Junior ²;
Silvana Petrofeza ¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

²Embrapa Arroz e Feijão GO-462 km. 12, Caixa Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio, Goiás.

petrofez@uol.com.br

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*; proteínas inibidoras de poligalacturonases; endopoligalacturonase; patogênese.

Introdução

Sclerotinia sclerotiorum (Lib) De Bary é um fungo fitopatogênico de amplo espectro de hospedeiros infectando cerca de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies ou variedades de plantas (Boland & Hall, 1994). Dentre as culturas comerciais afetadas, a do feijoeiro é a que mais sofre perdas na produção, sendo o número de sementes por planta e seu peso os componentes de rendimento mais afetados trazendo enorme prejuízo ao nosso país por sua importância sócio-econômica (Hall & Nasser, 1996).

Quando o fungo infecta uma planta hospedeira, seu primeiro desafio é vencer a barreira estrutural representada pela parede celular da planta. Para isso, secreta enzimas, como pectinases e cutinases que irão despolimerizar componentes da lamela média e parede celular primária da planta (Fraissinet-Tachet & Fevre 1996). Entre as enzimas secretadas estão as poligalacturonases (PGs), que estão envolvidas na degradação de pectina. Um maior interesse é dado às endopoligalacturonases (endo-PG) as quais são capazes de macerar os tecidos da planta promovendo a liberação de oligossacarídeos que são potentes sinalizadores celulares e podem ativar a resposta de defesa da planta hospedeira. As poligalacturonases são produzidas por bactérias, fungos e insetos (De Lorenzo & Ferrari, 2002). Entre os fungos produtores de poligalacturonases, destaca-se o fungo

de solo, *Sclerotinia Sclerotiorum* que, durante o crescimento, produz várias endo e exo-poligalacturonases (Cotton, et al., 2002).

No entanto, a planta, por sua vez, produz proteínas extracelulares inibidoras de poligalacturonases (PGIP), que especificamente inibem as poligalacturonases (PGs) de fungos (De Lorenzo e Ferrari, 2002; D'Ovidio et al., 2004). A interação com PGIP limita o potencial destrutivo de poligalacturonases, disparando as respostas de defesa o que reduz os sintomas da doença. As proteínas inibidoras de poligalacturonases interagem especificamente com as poligalacturonases por formação de um complexo. A interação PG-PGIP varia em termos de inibição e reflete contra-adaptação ocorrendo em ambos, enzimas e inibidores (Federici et al., 2001). Fungos patogênicos têm desenvolvido diferentes poligalacturonases para maximizar seu potencial ofensivo e conseqüentemente, plantas têm desenvolvido variações de PGIPs com diferentes especificidades para contraporem-se às muitas formas de PGs existentes na natureza. A importância das PGIPs na defesa de plantas tem sido confirmada por estudos *in vivo*. O arranjo e a similaridade entre genes de *Phaseolus vulgaris* L. sugere que eles derivem de um antecessor comum como o resultado de uma seqüência de eventos de duplicação e divergência gênica. Os quatro parálogos Pvpqip 1-4 formam dois pares Pvpqip1 / Pvpqip 2 e Pvpqip 3 / Pvpqip 4 que codificam funcionalmente distintas classes de PGIPs, que dedicam-se diferentemente para o reconhecimento de PGs de fungos (D'Ovidio et al., 2004).

Objetivos:

O presente trabalho teve por objetivos:

1. Analisar a expressão de genes que codificam para proteínas inibidoras de poligalacturonases (*pgip1*, *pgip2*, *pgip3* e *pgip4*) em plantas de feijoeiro submetidas a infecção pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.
2. Comparar os níveis de expressão de poligalacturonases (*PG5*, *PG6* e *PG7*) produzidas por *S. sclerotiorum* nos diferentes momentos do processo de infecção.

Materiais e métodos

Material biológico.

- O isolado SPS de *S. sclerotiorum* foi obtido de planta de feijoeiro infectada. O micélio foi mantido em cultura em ágar-batata (BDA). O isolado foi crescido em placa de Petri contendo BDA (Batata –dextrose-ágar) com pontas de palitos de dentes de

1 cm dispostas no meio. Após 5 dias estas pontas de palitos com o fungo foram inoculadas na haste de plantas de feijoeiro. As sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* [L.] cv. Pérola) foram fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As plantas cresceram em potes plásticos e foram mantidos a 24° C e fotoperíodo de 12 horas. A inoculação aconteceu 10 dias após a emergência pela introdução de palitos de dentes na base da haste a 1 cm da superfície. Para o controle do experimento foram introduzidos os palitos sem fungo nas hastes das plantas (injúria mecânica). As plantas foram mantidas por 48 horas a 20° C e 90% de umidade relativa para fornecer as condições para infecção.

As amostras de tecidos foram coletadas da parte necrosada de cada lesão com margem de 2 cm nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação (hpi). As amostras de tecidos foram armazenadas em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA.

RT-PCR semi-quantitativo

O RNA foi extraído do tecido da planta e do micélio fúngico pelo método do TRIZO (Gilco BRL), conforme instruções do fabricante. Para remover a contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase I (Promega) seguida de inativação da enzima (EDTA 2,5 mM, 65° C / 10 min) e precipitação com etanol.

A análise dos transcritos de endogalacturonases (PGs) do fungo e Proteínas Inibidoras de Poligalacturonases (PvPGIP) da planta foi feita através de RT-PCR semi-quantitativo. Os oligonucleotídeos específicos para PGs foram *pg1* [*pg1R* 5'-TCT TGC AGC AGG CGA GAA -3'; *pg1F* 5'-GTG TTG TGG CCG AGG GCG -3']; *pg3* [*pg3R* 5'-ACC CGG CAC TGT GGC TAC-3'; *pg3F* 5'-TGG GAC GGT ACG ACC CTC -3']; *pg5* [*pg5R* 5'-TGT CGG AGT TGT CAG TAG-3'; *pg5F* 5'-ATA CCA GCA TTT CCA TGG-3']; *pg6* [*pg6R* 5'-CAA GCT TAT TAA CAT GCG TGC-3'; *pg6F* 5'-CTG GAG TTG ACG ATT TAT GCA-3']; *pg7* [*pg7R* 5'-TCC GGT TAC GAG AAT GCC-3'; *pg7F* 5'-GCT CCT GGA CAC ATC CGG- 3']. Os transcritos de proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIP) foram amplificados usando oligonucleotídeos específicos para *PvPGIP1*, *PvPGIP2*, (ambos *PvPGIP2.1* e *PvPGIP2.2*). *PvPGIP3* e *PvPGIP4* como descrito por D'Ovidio et al. (2004).

A fita de cDNA foi sintetizada com 2 microgramas de RNA total tratado com DNase I usando a enzima Superscript II Transcriptase Reversa seguindo

recomendações do fabricante. Cinco microlitros da reação foi amplificada em uma reação final de 30 μ L contendo tampão Taq DNA polimerase 10X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M primers específicos, 5 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL). A PCR foi mantida inicialmente a 94° C por 1 min, 55°C por 1 min e 72 °C por 1 min. Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose (1,2 % p/v) por eletroforese. A quantificação dos níveis de expressão gênica foi verificada por análise de densitometria (Scion Image software) disponível on-line (<http://www.scioncorp.com>). A intensidade do produto amplificado foi expressa em unidades relativas de absorvância (AU). A razão entre a unidade relativa de absorvância determinada pela amplificação do gene de interesse e controle interno foi calculada para normalizar as variações de concentração das amostras como controle eficiente da reação.

Resultados e discussões

Expressão dos genes *PG* de *S. sclerotiorum* durante a patogênese

A interação patógeno-hospedeiro foi analisada a partir de hastes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e o micélio de *S. sclerotiorum*. Durante as primeiras 24 horas após o inoculo, o micélio desenvolveu e invadiu o tecido, mas os sintomas macroscópicos não foram detectados. Com 48 horas a zona de necrose foi observada em volta do inóculo e 72 hpi um abundante micélio aéreo emergia dos tecidos das plantas cuja maceração podia ser observada na superfície. Com 96 hpi o micélio tornava-se progressivamente mais abundante, enquanto que o tecido estava totalmente macerado (Fig. 1).

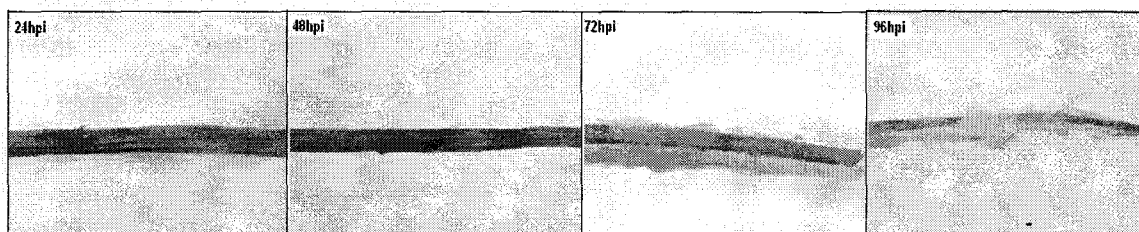


Figura1. Hastes de feijoeiro infectadas com *S. sclerotiorum* nos diferentes tempos após o inoculo. As amostras de tecidos foram coletadas da parte necrosada de cada lesão com margem de 2 cm nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação (hpi), respectivamente.

A expressão dos genes que codificam para poligalacturonases foi examinada em tecidos infectados para determinar quais fatores poderiam estar associados com o processo de infecção. Transcritos dos genes *pg1*, *pg3*, *pg5*, *pg6* e *pg7* foram detectados por RT-PCR 24 horas após o início da infecção (Fig. 2). Neste ponto a presença do fungo na planta não foi visualmente detectada. O nível máximo de transcritos de PG foi alcançado com 72 hpi quando a biomassa do fungo ainda não era máxima. O gene mais significativamente induzido durante as fases iniciais de infecção foi o *pg1*, o nível de transcritos aumentou grandemente até 96 hpi, tempo que as hastes foram completamente invadidas pelo micélio. O gene *pg3* foi expresso durante a fase inicial de colonização do tecido da planta saudável, revelando um máximo nível de expressão 24 hpi quando a biomassa do fungo era muito baixa. A expressão diminuiu nos últimos estágios de colonização. Este padrão de expressão sugere *pg3* pode estar mais envolvida nos estágios iniciais de colonização do hospedeiro que durante os últimos estágios de maceração dos tecidos do hospedeiro. O gene *pg5* foi altamente expresso com 24 hpi mantendo-se constante até 96 hpi (Fig. 2) estágio em que o tecido da planta estava completamente invadido pelo patógeno e com a zona de necrose bastante aumentada. O gene *pg6* foi regulado durante a fase final de maceração. A transcrição foi máxima com 72 hpi e então decresceu levemente quando o tecido estava totalmente macerado (96 hpi). O gene *pg7* foi expresso em 24 hpi e manteve o padrão de expressão constante. O fragmento de rDNA 28 S do fungo foi amplificado como controle para a quantidade total de mRNA presente em cada uma das amostras.

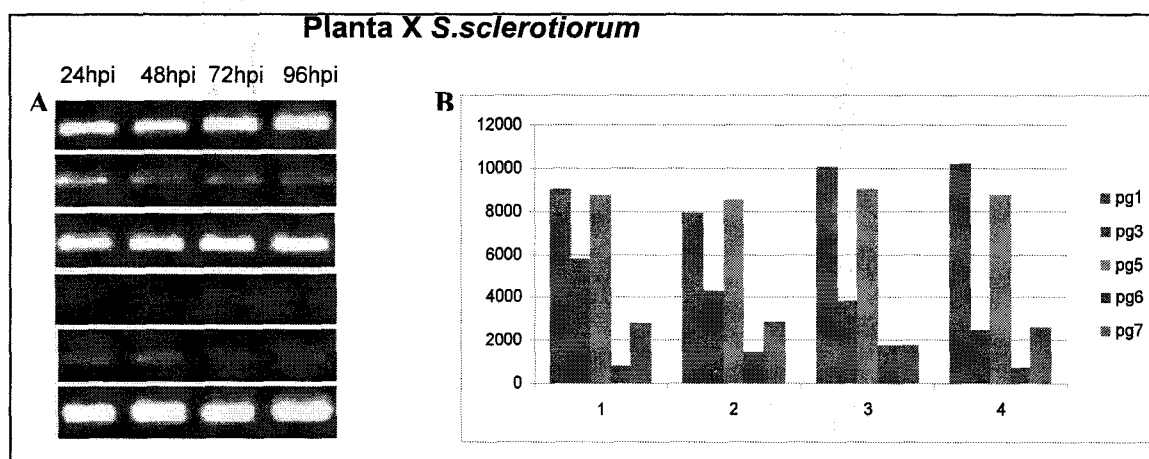


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose, os produtos de RT-PCR mostram o padrão de expressão dos genes que codificam para poligalacturonases (*PG1*, *PG3*, *PG5*, *PG6* e *PG7*)

de *S. sclerotiorum* durante a patogênese em hastes de feijoeiro (A). A análise quantitativa da expressão dos genes PGs foi realizada por densitometria pelo Scion Image software (<http://www.scioncorp.com>) . Os níveis foram calculados a partir da Unidade Relativa de Absorvância determinada pela amplificação do gene de interesse e seu controle interno (rDNA 28S) como visto no gráfico (B).

A expressão dos genes *PG* foi similar ao já relatado sobre *PGs* em outros isolados de *S. sclerotiorum* (Li et al., 2004; cotton et al., 2002; Ksza et al., 2004) embora os respectivos padrões tenham sido diferentes. Por exemplo, a expressão de *sspg1* procedeu como *sspg3*, *sspg5* e *sspg6* durante a infecção de cenoura com *S. sclerotiorum*, onde se observou que os genes *pg1-3* foram expressos durante a fase de colonização do tecido saudável, enquanto *pg5* foi transcrito durante a fase final de maceração e *pg6* e *pg7* exibiram um constante padrão de expressão (kasza et al, 2004). Em concordância com os resultados descritos por Li et al (2004), sob condições de patogenicidade, o gene *sspg1* de *S. sclerotiorum* foi altamente expresso durante a infecção, *sspg3* foi também expresso durante a fase inicial de infecção.

A aparente dependência da expressão do gene *pg1* com o pH foi proposta para justificar a liberação de ácido oxálico, um fator determinante de patogenicidade (Cessna et al, 2000). Evidências recentes sugerem que *sspg1* faz seu papel tanto na iniciação da infecção como na subsequente expansão da lesão durante a interação de *S. sclerotiorum* com *Brassica napus* (Li et al., 2004). A região regulatória do gene *sspg1* possui diversos sítios de ligação para o repressor CRE1, um fator envolvido na repressão do catabolismo de carbono e acredita-se restringir a expressão de *sspg1* sob condições saprofíticas (Reynond-cotton et al., 1996; Hegedus & Rimmer, 2005).

Análises dos padrões de expressão individual dos genes de *PGs* têm revelado que interações entre *PGs* e a resposta do hospedeiro durante vários estágios de infecção é coordenado. No início da patogênese, *S. sclerotiorum* secreta o ácido oxálico em tecidos infectados que progressivamente muda o pH neutro do apoplasma da planta para valores ácidos. No curso da infecção, a acidificação do meio e degradação de polímeros podem criar um ambiente que induz o ataque de *PGs* na parede celular da planta. Ocorre também a liberação de produtos de baixo peso molecular que servem para induzir no fungo a expressão de outros genes de

pg (Li et al., 2004; Fraissnet-Tachet and Fevre 1996). A falta da expressão de *pg3* e *pg6* nos pontos tardios de infecção (96 hpi) pode também indicar que outras enzimas pectinolíticas estão envolvidas em subsequente maceração do tecido e necrose da área interna da planta.

Outros resultados sugerem que os genes PGs são diferentemente regulados sob condições de parasitismo, a expressão de cada gene é governada pelo conjunto de condições ambientais, desenvolvimento e condições nutricionais. Entretanto, quais fatores individuais estão envolvidos no processo de infecção ainda devem ser elucidados.

Os membros da Família de *Pvpgip* são diferentemente regulados

Para verificar se os 4 genes *PGIP* apresentam diferente regulação durante a infecção patogênica, foram realizadas análises por RT-PCR usando oligonucleotídeos específicos para cada gene. Análises dos transcritos foram feitas com o RNA total extraído de hastes de feijoeiro com injúria mecânica (planta controle) ou infectada com *S. sclerotiorum*.

Oligonucleotídeos específicos para *Phaseolus vulgaris* (*Pvpgip1-4*) foram sintetizados como descrito previamente (D'Ovidio et al., 2004). Mesmo com alto número de ciclos de amplificação e amostras com concentrações de RNA maiores as normalmente utilizadas para a análise dos genes *Pvpgip*, a amplificação de *Pvpgip1-3* não ocorreu nas amostras extraídas das plantas controle. Interessantemente, somente o transcrito *Pvpgip 4* pareceu ser moderadamente induzido pela injúria mecânica (Fig. 3 A).

Análises de densitometria revelaram que os transcritos *PVpgip* são diferentemente induzidos em tecidos de hastes de feijoeiro em resposta a infecção por *S. sclerotiorum* (Fig. 3 B). Durante as fases iniciais de infecção o transcrito de *Pvpgip1* não foi detectado, enquanto sua presença foi revelada com 72 – 96 hpi, período em que as hastes estavam completamente invadidas pelo micélio. Foram observados altos níveis de expressão de *Pvpgip2* durante a fase inicial de colonização, com nível máximo com 48 hpi e declínio de 72 – 96 hpi, momento em que o tecido da planta começou a submeter-se à necrose. A expressão do transcrito *Pvpgip3* aumentou fortemente com 96 hpi. O transcrito *Pvpgip4* manteve-se constantemente presente de 24 hpi até o final do tempo do experimento. Entretanto

altos níveis de expressão desse gene foram detectados na área de lesão, maior que na planta com injúria mecânica (controle).

Esse padrão de lesão claramente mostra a seqüência transcricional de gene e sugere que *Pvpgip2* pode estar mais envolvido nos estágios iniciais de defesa e *Pvpgip1* e *Pvpgip3* durante a fase terminal. Análises realizadas por D'Ovidio e colaboradores (2004) resultaram na identificação de 4 *Pvpgips* em *Phaseolus vulgaris*. Individualmente, genes *Pvpgips* são diferentemente expressos em respostas ou tratamento com elicitores: a expressão de *Pvpgip3* é induzida por oligogalacturonídeos, mas não por ácido salicílico ou injúria; a expressão de *Pvpgip4* não foi alterada por nenhum dos tratamentos. A expressão de *Pvpgip1* foi induzida apenas pela injúria. *Pvpgip2* é regulado por oligogalacturonídeos, ácido salicílico e injúria (D'Ovidio et al., 2004).

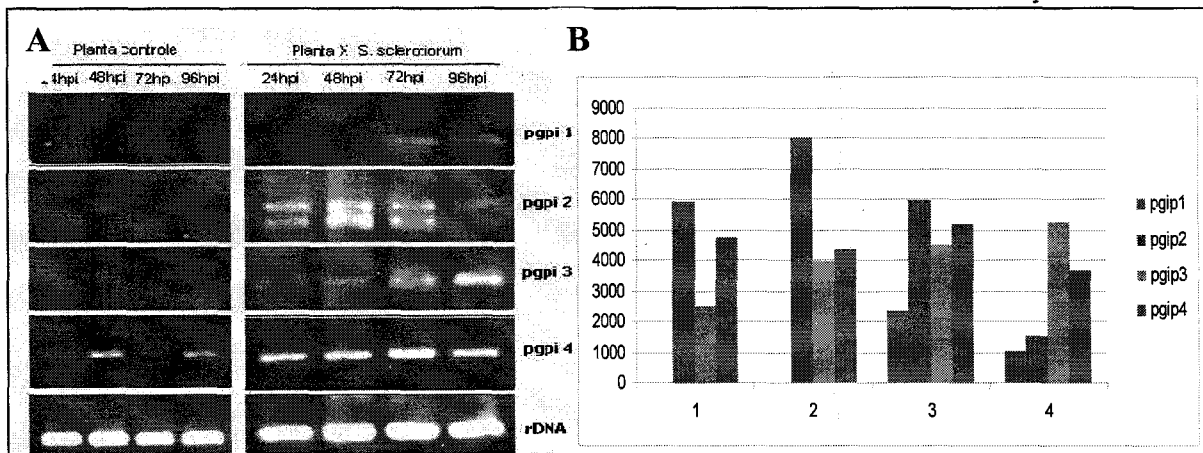


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose mostrando os diferentes níveis de expressão dos genes PGIP na planta que apenas sofreu injúria (controle) e as que foram infetadas com *S. sclerotiorum* (A). A análise semiquantitativa da expressão de *Pvpgips* foi realizada exatamente como descrita na figura 2 (B).

As defesas das plantas contra fungos patogênicos consistem em respostas localizadas que muitas vezes está associado com um estresse oxidativo e outros sistemas de respostas mediados por moléculas sinalizadoras. PGIPs têm sido mostradas como fator limitante para a invasão de fungos em plantas. Experimentos com tomate e uva transgênicos super-expressando genes *PGIP* de pêra (Powell, 2000; Aguero, 2005); arabidopsis super-expressando dois genes *PGIP* endógenos (Ferrari et al., 2003) e plantas de tabaco super-expressando *PGIP2* de feijoeiro (Manfredini et al., 2007), quando infectados com *B. Cinera*, desenvolveram lesões

menores que as plantas selvagens, sugerindo que PGIPs desenvolvem um papel na imunidade congênita de plantas e contribui para a resistência contra fungo.

A interação PG-PGIP limita o potencial agressivo das PGs e favorece o acúmulo de oligogalacturonídeos na apoplasto (De Lorenzo e Ferrari, 2002). Oligogalacturonídeos são elicitores de um grande número de respostas de defesa de plantas juntamente com o acúmulo de fitoalexinas, síntese de lignina, a expressão de β 1-3-glucanase, inibidores de proteases e a produção de espécies reativas de oxigênio (De Lorenzo e Ferrari, 2002; Ridkey et al., 2001). A capacidade das PGs induzir respostas de defesa por atividade enzimática foi considerada não relevante para a interação de *B. cinera* com planta de uva (Poinssot et al., 2003). Entretanto, a atividade enzimática de PG em *Colletotrichum lindemuthianum* tem sido mostrada ser essencial para ativar respostas de defesa em tabaco (Boudart et al., 2003).

Conclusões

Neste trabalho mostramos os diferentes níveis de expressão de poligalacturonases no processo de infecção. Estas enzimas promovem a liberação de fragmentos de polissacarídeos da parede celular e liberação de oligogalacturonídeos que são poderosas moléculas sinalizadoras. Podendo ativar resposta de defesa da planta pela elevação da expressão de proteínas inibidoras de poligalacturonases.

Trabalhos futuros poderão identificar proteínas específicas induzidas durante os primeiros passos da patogênese. Isso poderia ajudar no esclarecimento dos complexos programas que são a base do processo de infecção. Entretanto é crucial para a obtenção de plantas resistentes baseadas em estratégias através de PGIP o conhecimento das relações específicas entre PGs e PGIPs.

Referências:

- Aguero, C.B. (2005). Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. **Molecular Plant Pathology**, 6, 43-51.
- Alghisi, P. & Favaron, F. (1995) Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interactions. **European Journal Plant Pathology**, 101, 365–375.

- Annis, S.L. & Goodwin, P.H. (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, 103, 1– 14.
- Boland, G.J. & Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 16, 93-108.
- Boudart, G. (2003). Elicitor activity of a fungal endopolygalacturonase in tobacco required a functional catalytic site and cell wall localization. **Plant Physiology**, 131, 93-101.
- Cervone, F.; De Lorenzo, G.; Degra, L. & Salvi, G. (1987) Elicitation of necrosis in *Vigna unguiculata* Walp. by homogeneous *Aspergillus niger* endopolygalacturonase and by α -D-galacturonate oligomers. **Plant Physiology**, 85, 626–630.
- Cessna, S.G.; Searsa, V.E.; Dickmann, M.B. & Lowa, P.S. (2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**, 12, 2191–2199.
- Cotton, P.; Rascale, C. & Fevre, M. (2002). Characterization of PG2, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast. **FEMS Microbiology Letters**, 213, 239–244.
- D'Ovidio, R.; Raiola, A.; Capodicasa, C.; Devoto, A.; Pontiggia, D.; Roberti, S.; Galletti, R.; Conti, E.; O'Sullivan, D. & De Lorenzo, G. (2004). Characterization of the Complex Locus of Bean Encoding Polygalacturonase-Inhibiting Proteins Reveals Subfunctionalization for Defense against Fungi and Insects. **Plant Physiology**, 135, 2424–2435.
- De Lorenzo, G. & Ferrari, S. (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. **Current Opinion Plant Biology**, 5, 295–299.
- De Lorenzo, G.; D'Ovidio, R. & Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**, 39, 313–335.
- Ferrari, S.; Vairo, D.; Ausubel, F.M.; Cervone, F. & De Lorenzo, G. (2003) Tandemly duplicated Arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. **Plant Cell**, 15, 93–106.

- Fraissinet-Tachet, L. & Fevre, M. (1996). Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Current Microbiology**, 33, 49–53.
- HALL, R.; NASSER, L.C.B. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 18: 176-185, 1996
- Hegedus, D.D. & Rimmer, S.R. (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? **FEMES Microbiology Letters**, 251, 177-184.
- Isshiki, A.; Akimitsu, K.; Yamamoto, M. & Yamamoto, H. . (2001) Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 14, 749–757
- Kasza, Z.; Vagvolgyi, C.; Févre, M. & Cotton, P. (2004). Molecular characterization and in planta detection of *Sclerotinia sclerotiorum* endopolygalacturonase genes. **Current Microbiology**, 48, 208-213.
- Li, R.; Rimmer, R.; Yu, M.; Sharpe, A.G.; Seguin-Swartz, G.; Lydiate, D. & Hegedus, D.D. (2003) Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. **Planta**, 217, 299–308
- Manfredini, C.; Sicilia, F.; Ferrari, S.; Pontiggia, D.; Salvi, G.; Caprari, C.; Lorito, M. & De Lorenzo, G. (2005). Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 67,108-115.
- Oeser, B.; Heidrich, P.M.; Muller, U.; Tudzynski, P. & Tenberge, K.B. (2002) Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea* rye interaction. **Fungal Genetics and Biology**, 36, 176–186.
- Poinssot, B.; Vandelle, E.; Bentejac, M.; Adrian, M.; Levis, C.; Brygoo, Y.; Garin, J.; Sicilia, F.; Coutos-Thevenot, P. & Pugin, A. (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 16, 553–564
- Powell, A.L.T.; van-Kan, J.; ten-Have, A.; Visser, J.; Greve, L.C.; Bennett, A.B. & Labavitch, J.M. (2000) Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. **Molecular Plant–Microbe Interaction**, 13, 942–950.

- Reymond-Cotton, P.; Fraissinet-Tachet, L. & Fevre, M. (1996). Expression of the *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase pg1 gene: possible involvement of CREA in glucose catabolite repression. **Current Genetics**, 30, 240–245.
- Ridley, B.L. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, 55, 929-967.
- ten Have, A.; Mulder, W.; Visser, J. & van Kan, J.A.L. (1998) The endopolygalacturonase gene BcpG1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant–Microbe Interaction**, 11, 1009–1016.
- ten Have, A.; Wendy Oude Breuil, W.O.; Jos, P.; Wubben, J.P.; Visser, P. & van Kan, J.A.L. (2001). *Botrytis cinerea* Endopolygalacturonase Genes Are Differentially Expressed in Various Plant Tissues. **Fungal Genetics and Biology**, 33, 97–105.