

**PODREDUMBRE POST-COSECHA DEL ZAPALLO TIPO BUTTERNUT
(*CUCURBITA MOSCHATA* DUCH.) ACTIVIDAD ENZIMATICA DE *FUSARIUM* SPP.**

Gladys A. Lori^{1*}, Silvia M. Wolcan^{1*}, Guillermo O. Sarli^{2**}
y Mariel E. Lavagna^{2**}

¹ Laboratorio de Fitopatología, ² Laboratorio de Física Biológica.
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, U.N.L.P.
Calle 60 y 118. CC 31 (1900) La Plata-Buenos Aires- Argentina.

Palabras clave: *Cucurbita moschata*, *Fusarium* spp, podredumbre del fruto, enzimas pectinolíticas y celulolíticas.

Key words: *Cucurbita moschata*, *Fusarium* spp, fruit rot, pectinolytic and cellulolytic enzymes.

RESUMEN

El zapallo tipo butternut (*C. moschata*) es el de mayor consumo en la Argentina. Durante el almacenamiento, está expuesto a podredumbres ocasionadas por distintas especies de *Fusarium* con diferente virulencia. Para establecer alguna correlación entre la patogenicidad y la actividad enzimática, con 22 cepas de dichas especies, se evaluó la producción "in vitro" de enzimas pectinolíticas y celulolíticas. Para la determinación se consideró la disminución de la viscosidad que produjo el filtrado de los hongos sobre sus respectivos sustratos. Se comprobó que todas las cepas produjeron ambos grupos de enzimas pero no se pudo establecer la correlación entre la capacidad patogénica de las mismas y su actividad enzimática.

INTRODUCCION

En la última década, en la Argentina, el zapallo tipo butternut (*Cucurbita moschata* Duch.) conocido como "anquito," ha desplazado a cultivares tradicionales (Carafenchos, 1987). Los frutos tipo butternut pueden almacenarse sin condiciones controladas por 2 a 3 meses

SUMMARY

[Post-harvest rots of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) "butternut" type. Enzymatic activity of *Fusarium* spp.]

The "butternut" type pumpkin (*Cucurbita moschata*) is the most marketable vegetable in Argentina. *Fusarium* spp. exhibiting different pathogenicity, cause various rots during storage. Twenty two strains of *Fusarium* spp. were tested to study pectinolytic and cellulolytic enzymes production. The purpose of this work was to find any correlation between pathogenicity and enzyme activity. It was measured by reading viscosimetric reduction after filtration of fungi over their corresponding substrate. The results indicated that all the strains, pathogenic and saprophytic, were able to produce both group of enzymes and no correlation was found between pathogenic and enzymatic activity.

posteriores a la cosecha. La prolongación del período de conservación es importante para lograr un buen producto en la época de menor oferta (invierno). Estos zapallos poseen una epidermis muy delgada que les confiere una gran susceptibilidad a los daños mecánicos, como rajaduras y contusiones, a consecuencia de las cuales suelen estar expuestos a podredumbres fúngicas. Vigliola &

* Investigadoras de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

** Docentes de la Facultad de Cs. Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.

Baron (1990) citaron que distintas especies de *Fusarium* junto con *Rhizopus stolonifer* son los agentes que provocan las pérdidas más importantes durante el almacenamiento, siendo mayor la incidencia de *Fusarium* spp. durante el mes de julio. También en Arkansas, Correll & Mitchell (1991) han observado periódicamente importantes pérdidas en calabazas, debidas a podredumbres producidas por *F. equiseti*.

En trabajos previos (Lori & Wolcan, 1990), quedó demostrado, que si bien desde los frutos con podredumbre es posible aislar varias especies y cepas del género *Fusarium*, no todas son las responsables del proceso patogénico. Se comprobó que el mismo se inicia y continúa únicamente cuando existe una lesión en el fruto, sin importar su dimensión. Las diferencias de virulencia que se encontraron en las especies aisladas, podrían atribuirse a sus actividades enzimáticas. Muchos *Fusarium* spp. responsables de enfermedades de importancia económica, se caracterizan por sintetizar enzimas pectinolíticas y celulolíticas (Ferraris et al., 1974, Husain & Dimond, 1960, Waggoner & Dimond, 1955).

En las podredumbres de frutos, como de otras estructuras vegetales, se produce la destrucción del tejido como consecuencia de la actividad enzimática de los microorganismos. En alguna etapa de la patogénesis hay una interacción entre el patógeno y los hidratos de carbono del hospedador. Estos compuestos determinan la actividad del primero para producir enzimas capaces de degradar la pared celular del vegetal (Albersheim et al., 1969).

Las pectinas conjuntamente con otros polímeros, constituyen la parte fundamental del cemento intercelular (laminilla media) manteniendo unidas a las células. Las enzimas pécticas facilitan el desarrollo intercelular del patógeno en el hospedador y permiten al primero, obtener nutrientes a partir del tejido infectado. La poligalacturonasa (PG) y la pectatoliasa, rompen los ligamentos α -1,4 glicosídicos, liberando ácidos pécticos y desorganizando los tejidos del vegetal (Bateman & Millar, 1966). Por otra parte la pared celular primaria contiene un porcentaje apreciable de celulosa y hemicelulosa ligada a la pectina. Existen enzimas específicas que inician el proceso de maceración por ruptura de esos ligamentos, sumándose también la participación de celulasas (Cx) (Brown, 1965; Wood, 1960).

En el presente estudio, donde empleamos distintas especies y cepas de *Fusarium*, aisladas en trabajos previos, a partir de frutos de zapallo con podredumbre, se intentó detectar la producción de enzimas hidrolíticas para establecer una posible correlación entre la patoge-

MATERIALES Y METODOS

nicidad y la actividad enzimática de dichas cepas.

Se utilizaron 22 cepas pertenecientes a 8 especies de *Fusarium*, aisladas a partir de frutos enfermos, de las cuales 10 fueron no patógenas y las restantes con diferente virulencia (Tabla 1). Luego de realizar las pruebas de patogenicidad (Lori & Wolcan, 1990), las cepas se mantuvieron en APG en condiciones de laboratorio durante 5 meses. Antes de la determinación de la actividad enzimática cada una se revitalizó inoculándolas en frutos de anquito según la técnica descrita con anterioridad (Lori & Wolcan, 1990). La misma consistió básicamente en efectuar una lesión superficial en la corteza de trozos de los frutos sobre los cuales se depositó el inóculo.

Tabla 1.
Fusarium spp. y virulencia de las cepas aisladas a partir de frutos (*C. moschata*) con podredumbre

<i>Fusarium</i> spp.	cepa N°	Virulencia (*)
<i>F. sambucinum</i> Fuckel var. <i>coeruleum</i> Woll.	1-2-3-4-5-6-7-8	++
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	9-10-11	+
<i>F. semitectum</i> Berk & Rav.	12 13	+ -
<i>F. Oxysporum</i> Schl.	14-15	-
<i>F. moniliforme</i> Scheldon	16	-
<i>F. graminearum</i> Schwabe	17-18	-
<i>F. equiseti</i> (Corda) Sacc.	19-20	-
<i>F. dimerum</i> Penzig in Saccardo	21-22	-

(*) ++ : Altamente virulenta;
+ : medianamente virulenta
- : No patógena

Para la actividad enzimática, cada una de las cepas se sembró en Erlenmeyers de 250 ml, conteniendo 50 ml de un medio de cultivo líquido. Para el caso de las enzimas pectinolíticas se empleó el medio de Czapek (Ainsworth et al., 1971), en el cual se reemplazó el nitrato de sodio por nitrato de amonio y parte de la sacarosa (10

g) por igual cantidad de pectina de manzana. Para la evaluación de las enzimas celulolíticas se utilizó el medio líquido de Richard (Ainsworth *et al.*, 1971), en el cual se reemplazó la totalidad de la sacarosa por 0,5% de carboximetil celulosa sódica (CMC). Esta última, como la pectina de manzana, actúa como inductora para la producción de enzimas. Se incubaron a 23-25°C durante 7 días en oscuridad continua. Luego se separó el micelio por centrifugación a 3500-4000 rpm, durante 20 min a 2°C y con el sobrenadante se realizaron los ensayos para evaluar la actividad de las enzimas hidrolíticas.

Para probar la actividad de la poligalacturonasa (PG), se mezclaron 5 ml del filtrado del hongo con 50 ml de una solución de pectina de manzana al 0,5% y 10 ml de acetato de sodio 0,5 M pH 4,5. En el caso de la celulasa (Cx), se mezcló 1 ml del filtrado del hongo con 5 ml de CMC sódica al 0,5% preparada en buffer citrato a pH 5,5.

La actividad de la PG y Cx se evaluó mediante la disminución de la viscosidad que produjo el filtrado de los hongos sobre sus respectivos sustratos. Se tomaron las medidas en función del tiempo (180 min) y se relacionaron con la viscosidad del testigo (mezcla de reacción sin el filtrado del hongo). Se utilizó el viscosímetro Fenske-Ostwald, en un baño termostatzado a 30°C (Deshpande, 1960).

RESULTADOS Y DISCUSION

Nuestros resultados demostraron que todas las cepas ensayadas (patógenas y no patógenas), producen los dos tipos de enzimas (Figura 1). Cuando se midió la actividad de la PG y Cx en la mayoría de las cepas se observó un descenso brusco de la viscosidad en los primeros 60 min, continuando el proceso lentamente hasta finalizar la prueba (180 min), en que los valores se mantuvieron constantes. La disminución de la viscosidad en algunas cepas fue superior al 70% y al 80% para la actividad de la PG y Cx respectivamente (Figura 1). La solución testigo en todas las pruebas mantuvo sus valores iniciales constantes a lo largo del ensayo.

En la producción de los 2 tipos de enzimas hubo una gran variabilidad entre las cepas ensayadas, aún dentro de una misma especie con virulencia similar. Con

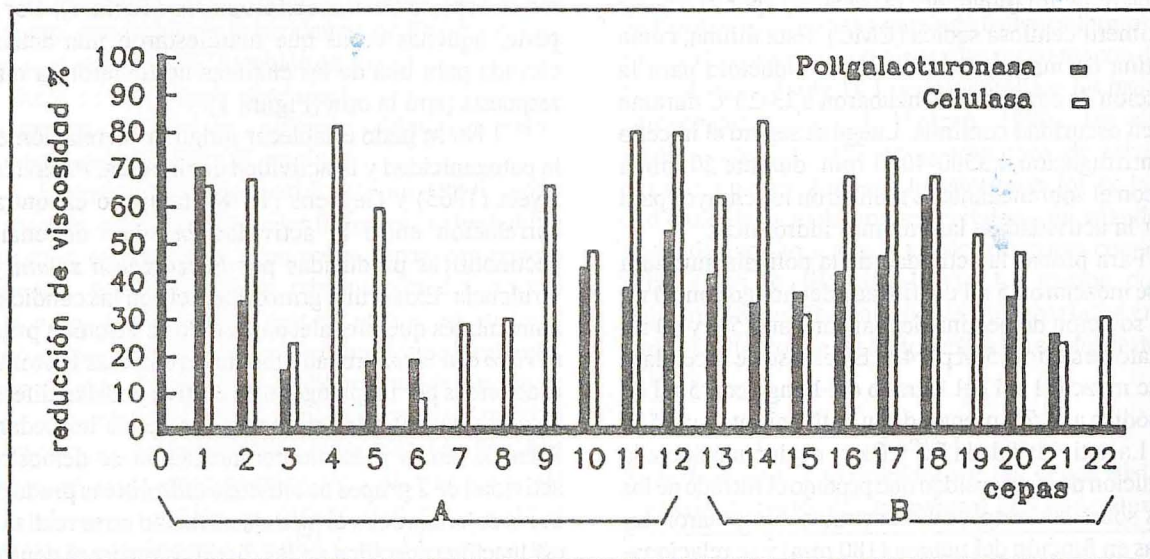
respecto a la actividad de la PG se observó que en las cepas consideradas no patógenas fue mayor que en las de *F. sambucinum* var *coeruleum* (excepto la cepa N° 1), que fue la especie de mayor virulencia (Tabla 1). Por otra parte, aquellas cepas que manifestaron una actividad elevada para una de las enzimas no tuvieron la misma respuesta para la otra (Figura 1).

No se pudo establecer ninguna correlación entre la patogenicidad y la actividad enzimática. Papavizas & Ayers (1965) y Geypens (1978), tampoco encontraron correlación entre la actividad *in vitro* de enzimas pectinolíticas producidas por *Rhizoctonia solani* y su virulencia. Existe una gran diferencia en las condiciones ambientales que prevalecen cuando se efectúan pruebas *in vitro* e *in vivo*. Probablemente las enzimas hidrolíticas producidas por un patógeno en cultivo podrían diferir de aquellas encontradas en los tejidos de los hospedantes. Además, en la presente comunicación se demostró la actividad de 2 grupos de enzimas hidrolíticas producidas *in vitro*, aunque con el método utilizado no se realiza una evaluación específica de las distintas enzimas dentro de cada grupo, la aplicación del mismo permite una determinación preliminar de la actividad enzimática (Hours et al., 1988). Dado que en los procesos patológicos suelen intervenir además de las enzimas PGy la Cx, endoenzimas y otros metabolitos cuya participación también es importante, serían necesarias otras pruebas más específicas que separen y caractericen las enzimas purificadas, tal como la electroforesis (Cruickshank & Wade G 1980; Hours et al, 1988). Esto permitiría aclarar si existen diferencias entre las cepas con diferente virulencia.

Por otra parte, cabe destacar, que muchas de las cepas consideradas no patógenas y probadas en este ensayo, si bien no produjeron un efecto macerante en los frutos de anquito, juegan un papel importante como saprófitos celulolíticos y pectinolíticos encargados de degradar los restos vegetales en el suelo (Gordon & Okamoto, 1990).

Finalmente, la hipótesis que se planteó en cuanto a una correlación entre la producción de enzimas hidrolíticas y la patogenicidad de *Fusarium* spp. permanece aún sin resolver.

Fig 1. Actividad de la poligalacturonasa y celulasa producida por especies de *Fusarium* aisladas de zapallos "anquito" con podredumbre. (A= cepas patógenas, B= cepas no patógenas)



REFERENCIAS

- Ainsworth, G., James, P. & Hawksworth, D. (1971). Dictionary of the fungi. Comm. Mycol. Inst. Kew. Surrey. England. 663 pp.
- Albersheim, P., Jones, T. & English, P. (1969). Biochemistry of the wall in relation to infective processes. Ann. Rev. Phytopath. 7: 171-194.
- Bateman, D. & Millar, R. (1966). Pectic enzymes in tissue degradation. Ann. Rev. Phytopath. 4: 119-146.
- Brown, W. (1965). Toxin and cell-wall dissolving enzymes in relation to plant diseases. Ann. Rev. Phytopath. 3: 1-18.
- Carafenchos, M. (1987). Coservación del zapallo "Butternut". Boletín de la Sección Horticultura de la EEA San Pedro. INTA. 6 pp.
- Correll, J. & Mitchell, J. (1991). Fruit rot of pumpkin in Arkansas caused by *Fusarium equiseti*. Plant Dis. 75: 751.
- Cruickshank, R. & Wade, G. (1980). Detection of pectic enzymes in pectin acrylamide gels. Anal. Biochem. 107: 177-181.
- Deshpande, K. (1960). Studies on the pectinolytic enzymes system of *Rhizoctonia solani* Kuhn. IV. Viscosity reducing enzymes. Enzymologia 22: 295-306.
- Ferraris, L., Garibaldi, A. & Matta, A. (1974). Polygalacturonase and polygalacturonate trans-eliminase production *in vitro* and *in vivo* by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytopathol. Z. 81: 1-14.
- Geypens, M. (1978). Enzymatic production and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates. Ann. Phytopathol. 10: 335-363.
- Gordon, T. & Okamoto, D. (1990). Colonization of crop residue by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. Phytopathology 80: 381-386.
- Hours, R.; Voget, C. & Ertola, R. (1988). Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. Biol. Wastes 23: 221-228.
- Husain, A. & Dimond, A. (1960). Role of cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytopathology 50: 329-331.
- Lori, G. & Wolcan, S. (1990). Patogenicidad post-cosecha del zapallo tipo butternut (*Cucurbita moschata*). Fitopatol. bras. 15: 336-339.
- Papavizas, G. & Ayers, W. (1965). Virulence, host range, and pectolytic enzymes of single-basidiospore isolates of *Rhizoctonia praticola* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 55: 111-116.
- Vigliola, M. & Baron, C. (1990). Condiciones sanitarias del almacenamiento del zapallo tipo butternut (*Cucurbita moschata* Duch). Rev. Fac. Agronomía 11: 61-70.
- Waggoner, P. & Dimond, A. (1955). Production and role of extracellular pectic enzymes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytopathology 45: 79-87.
- Wood, R. (1960). Pectic and cellulolytic enzymes in plant diseases. Ann. Rev. Plant Physiology 11: 299-322.