

Enzimas que degradan paredes vegetales en *Fusarium oxysporum*

C. VÁZQUEZ, R. SELLEK y N. FERNÁNDEZ

Se han estudiado las variaciones de las siguientes actividades enzimáticas: β -glucosidasa, endo β -1,4 glucanasa, exo β -1,4 glucanasa y laminarinasa en tres aislamientos de *Fusarium oxysporum*.

Este hongo produce un complejo enzimático extracelular con actividad laminarinasa, endo β -1,4 glucanasa y β -glucosidasa en un medio de cultivo con pectina como fuente de carbono.

Las actividades más significativas fueron producidas por cepas responsables de daños vasculares, aunque no siempre la mayor actividad se corresponde con la mayor virulencia.

C. VÁZQUEZ, R. SELLEK y N. FERNÁNDEZ. Dpto. de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

Palabras claves: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum radidis lycopersici*. Celulasas y laminarinasa.

INTRODUCCION

Fusarium oxysporum es un hongo fitopatógeno, de gran interés económico ya que ocasiona grandes pérdidas en numerosos cultivos. Produce esta especie una batería de enzimas capaces de degradar polisacáridos complejos de las paredes celulares.

Como se sabe, las paredes vegetales tienen tres constituyentes poliméricos fundamentales: celulosa, hemicelulosa (polisacáridos no celulíticos que incluyen glucanos, mananos y xilanos) y lignina, que posee una estructura polifenólica compleja.

El polímero mejor conocido de cuantos forman parte de la pared vegetal es la celulosa, que constituye entre un 20 y un 30 % del peso seco de la mayoría de las paredes primarias. Su cadena elemental corresponde a la de un glucano con enlaces β entre el carbono 1 y 4.

Las enzimas que hidrolizan celulosa, producidas por microorganismos, tienen reper-

cusión en la podredumbre de la madera, en la rotura de paredes celulares y en la maceración de tejidos. También pueden jugar un papel importante en la invasión del patógeno en el vegetal, en la penetración intra e intercelular de los tejidos del huésped y en el desarrollo del marchitamiento.

El complejo celulosa está integrado por tres actividades enzimáticas: la enzima C1 que libera las cadenas de glucano de la fibra de celulosa, proporcionando el sustrato de la enzima Cx o endoglucanasa que hidroliza los enlaces β -1,4 glucosídicos, dando como productos de reacción oligosacáridos solubles. Cx sola no es capaz de hidrolizar celulosa nativa y puede ser producida por organismos celulolíticos y no celulolíticos, y, por otra parte, presenta actividad frente a carboximetilcelulosa y otros derivados solubles de celulosa con bajo grado de sustitución.

La enzima exoglucanasa se ha identificado en preparaciones de muy pocos organis-

mos. La presencia de esta enzima siempre está acompañada de endoglucanasa, y libera celobiosa de los glucanos.

β -glucosidasa es la actividad que completa el sistema celulasa. No se puede considerar una celulasa propiamente dicha, aunque su papel es esencial para hidrolizar la celobiosa, que es un fuerte inhibidor de la exoglucanasa (BERGHEM, 1975).

El interés del estudio de β -1,3 glucanasas producidas por hongos está plenamente justificado, puesto que se han descrito estas actividades, concretamente en tomate, como enzimas que aparecen en el vegetal en respuesta a la infección e implicadas en reacciones de defensa del vegetal (FERRARIS, 1987; JOOSTEN, 1989). Por ello, el conocimiento de la capacidad productora del hongo se hace necesaria para detectar diferencias entre las actividades de ambos orígenes.

En este trabajo hemos seguido las actividades que degradan celulosa y β -1,3 glucanos por *Fusarium oxysporum* en un medio con pectina como fuente de carbono, durante un período de 24 días, con el objeto de aportar datos sobre la relación entre la secreción de las enzimas que degradan paredes y la capacidad patogénica del hongo.

MATERIAL Y METODOS

Organismos y condiciones de cultivo

Para el presente trabajo se han utilizado tres cepas de *Fusarium oxysporum*. Dos correspondieron a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL raza 0 y 1) y la tercera cepa fue un aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (FORL), todos ellos proporcionados por el Dr. Tello del Dpto. Protección Vegetal del INIA.

Estas cepas fueron mantenidas en PDA y el medio de cultivo para el ensayo enzimático fue Czapeck-Dox modificado (VÁZQUEZ, 1986) donde la fuente de carbono fue sustituida por pectina al 1 %.

Los inóculos se prepararon a partir de suspensiones de conidios preparadas en agua estéril con cultivos de 7 días sobre PDA. Se utilizaron 0,5 ml de esta suspensión como unidad de inóculo por cada matraz con 20 ml de medio.

Una vez inoculados, se incubaron a 25 °C. Periódicamente se tomaron muestras separando el micelio por filtración al vacío y el líquido metabólico se utilizó como fuente de enzimas.

Determinaciones enzimáticas

La actividad β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) se determinó según el método de EBERHART (1961), valorando el paranitrofenol liberado mediante la lectura a 410 nm. El sustrato utilizado fue paranitrofenil- β -D-glucopiranosido al 0,1 % en tampón acetato 50 mM y pH 5,0. Una unidad de actividad β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μ mol de paranitrofenol por minuto y por ml.

La actividad endoglucanasa (EC 3.2.1.4) hidroliza al azar enlaces β -1,4 glucosídicos. El sustrato utilizado fue carboximetilcelulosa al 2 % en tampón acetato 50 mM y pH 5,0 y la actividad fue valorada por la reducción de la viscosidad. Se considera una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para catalizar un decrecimiento de la viscosidad del 1 % (KEEN y HORTON, 1966).

Las actividades exoglucanasa y laminarinas se valoraron por el incremento de grupos reductores por el método de SOMOGYI (1945) y NELSON (1944) utilizando como sustratos avicel y laminarina respectivamente en tampón acetato 50 mM y pH 5,0. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para la liberación de un μ mol de grupos reductores por minuto y por ml.

Paralelamente a los ensayos enzimáticos se determinaron el pH, el peso seco, las sustancias reductoras y las proteínas por el método de LOWRY (1951).

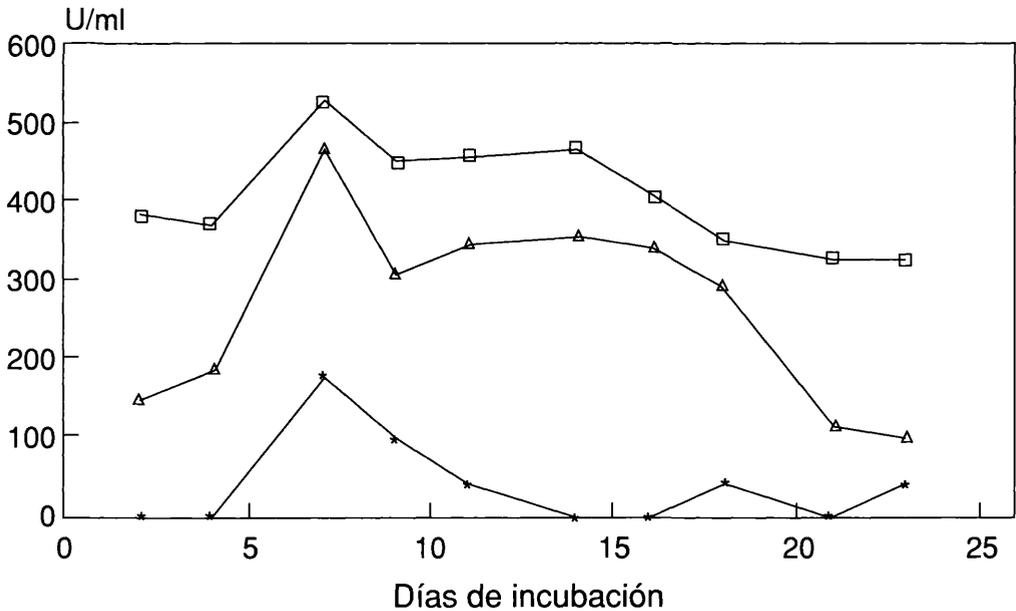


Fig. 1.—Actividad Endoglucanasa a lo largo de 25 días de incubación en tres aislamientos de *Fusarium oxysporum*. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 0 (□), *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 (Δ) y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (*).

RESULTADOS

El crecimiento máximo para los tres aislamientos se alcanza entre los cuatro y los seis días de incubación, con valores de peso seco entre 70 y 85 mg/muestra. A partir de los seis días y paralelamente al consumo, prácticamente total, de la fuente de carbono, observamos una pérdida de peso seco, como corresponde al proceso autodegradativo.

La actividad endoglucanasa en FORL presenta valores muy bajos durante el período ensayado y bajo las condiciones descritas. Muestra únicamente actividad entre los siete y diez días de cultivo, suponiendo solamente un 30 % de la actividad manifestada por los dos *Fusaria* vasculares; en éstos, la actividad sobre CMC se manifiesta desde las 48 horas de incubación y se mantiene durante todo el ensayo (Fig. 1).

β -glucosidasa es producida por los tres aislamientos con posterioridad a la detección de endoglucanasa, y se libera al medio

a partir de los nueve días de incubación, observándose niveles crecientes hasta la finalización del ensayo. De nuevo FORL es el menos significativo respecto a esta actividad y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 el más activo, alcanzando las 140 unidades/ml (Fig. 2).

La actividad β -1,3 glucanasa no se detecta en los hongos vasculares hasta agotada la fuente de carbono y se alcanzan los valores más altos a los 20 días de incubación (Fig. 3). El nivel para FORL es muy inferior y la secuencia de producción parece diferir claramente de los hongos vasculares (Fig. 3).

DISCUSION

La primera observación que conviene resaltar como consecuencia del estudio detallado de los resultados es la mayor capacidad enzimática de los hongos vasculares. Estos datos son aún insuficientes para ha-

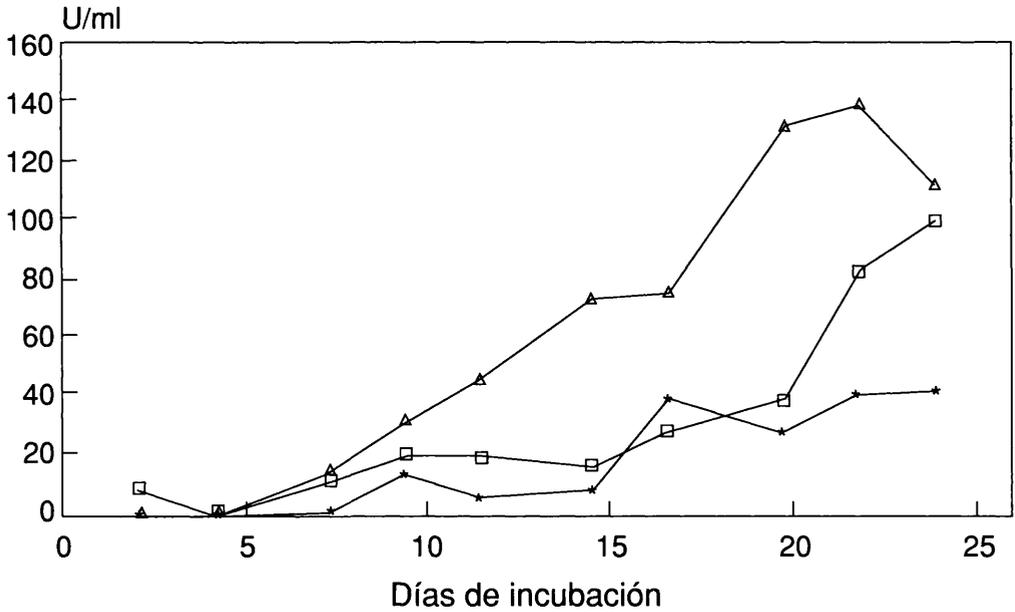


Fig. 2.—Actividad β -glucosidasa a lo largo de 25 días de incubación en tres aislamientos de *Fusarium oxysporum*. *F. oxysporum* f. sp. lycopersici raza 0 (□), *F. oxysporum* f. sp. lycopersici raza 1 (Δ), y *F. oxysporum* f. sp. radices lycopersici (*).

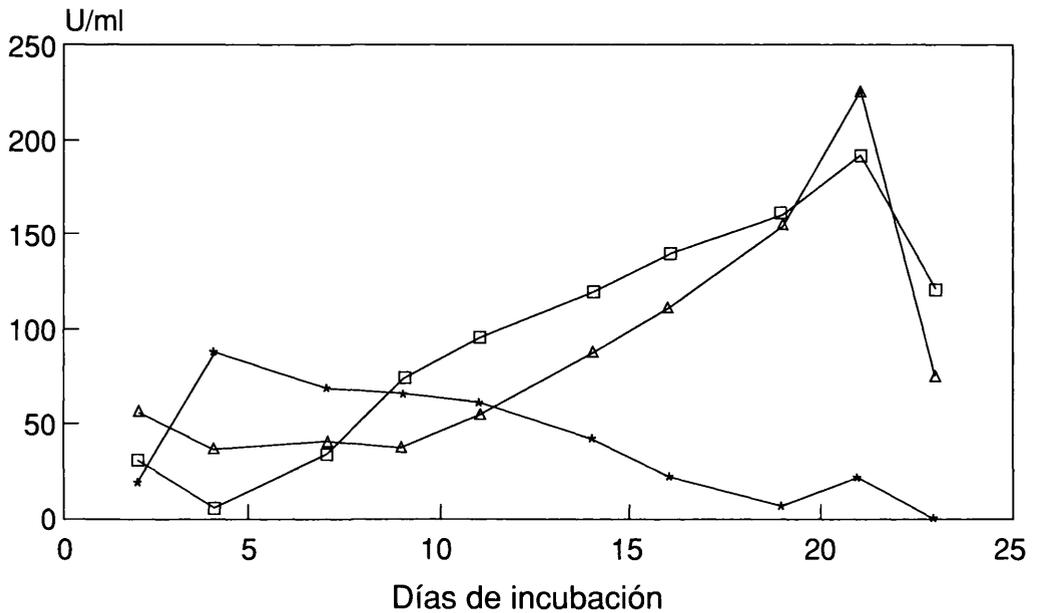


Fig. 3.—Actividad β -1,3 glucanasa a lo largo de 25 días de incubación en tres aislamientos de *Fusarium oxysporum*. *F. oxysporum* f. sp. lycopersici raza 0 (□), *F. oxysporum* f. sp. lycopersici raza 1 (Δ), y *F. oxysporum* f. sp. radices lycopersici (*).

cer generalizaciones sobre diferentes comportamientos relacionados con diversas patologías. Sin embargo son datos interesantes y que en un futuro se deberían confirmar con nuevos aislamientos.

Quisiéramos destacar la presencia de actividad carboximetilcelulosa en un medio con pectina, en contraposición con otros casos descritos como *Verticillium albo-atrum*, el cual no manifiesta ninguna actividad sobre CMC cuando crece sobre pectina (CARDER, 1987; GUPTA y HEALE, 1971). En nuestro caso los productos del catabolismo de la pectina son menos efectivos como represores de la síntesis enzimática.

Celulasas constitutivas fueron señaladas para *Verticillium albo-atrum* aislado de tomate (COOPER, 1973) sobre glucosa.

Podemos considerar la actividad carboximetilcelulasa constitutiva para FOL raza 0 y raza 1, ya que aparecen en un medio de cultivo sin inductor específico y no sujetas a represión catabólica, puesto que se detectan con concentraciones 4,5 y 2 mM de azúcar respectivamente (Fig. 1). Sin embargo en FORL no aparece la actividad hasta que el nivel de glucosa es inferior a 1 mM. Qui-

zás no exista un único e idéntico mecanismo regulador para todas las actividades de un mismo tipo.

El comportamiento de β -glucosidasa seguiría un modelo clásicamente inductivo, en este caso el inductor correspondería a monómeros no celulolíticos (inducción gratuita), señalado ya por GUPTA (1971), SANDHU (1982) y SHEWALE (1978) que irían apareciendo como consecuencia de la progresiva degradación de las paredes. Por otra parte los cambios en la concentración de estos inductores podrían explicar diferentes niveles de actividad β -glucosidasa para las tres cepas.

En las condiciones descritas no se encontró ninguna actividad exoglucanasa.

Las actividades β -1,4 glucanasa y β -1,3 glucanasa son siempre significativamente más altas para los aislamientos vasculares que para el responsable de podredumbre, pero no siempre los valores más altos correspondieron con la cepa más virulenta. Esto hace pensar que otros factores del hospedador deberán jugar también un papel en la manifestación de esa relación.

ABSTRACT

VÁZQUEZ, C., R. SELLEK y N. FERNÁNDEZ (1992): Enzimas que degradan paredes vegetales en *Fusarium oxysporum* Bol. San. Veg. Plagas, 18 (4): 693-698.

Variations in the activities of β -glucosidase, endo 1,4- β -glucanase, exo 1,4- β -glucanase and laminarinase of three isolates of *Fusarium oxysporum* have been studied. This fungi produced an extracellular enzymic complex with laminarinase, endo 1,4- β -glucanase and β -glucosidase in a medium with pectin as carbon sources.

The highest activities were produced by vascular strains, but not always, the highest activity is related with the most virulence.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, activities enzymatics.

REFERENCIAS

- BERGHEM, E. R.; PETTERSSON, L. G.; AXIO-FREDIKSSON, U. B., 1975: The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Characterization and enzymatic properties of a β -1,4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. Eur. J. Biochem., 53: 55-62.
- CARDER, J. H.; HIGNETT, R. C.; SWINBURNE, T. R., 1987: Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their in vitro secretion of cell-wall degrading enzymes. Physiol. Mol. Plant Pathol., 31: 441-452.

- COOPER, R. M.; WOOD, R. K. S., 1975: Regulation of synthesis of cell wall-degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.*, **5**: 135-156.
- EBERHART, B. H., 1961: Exogenous enzymes of *Neurospora* conidia and mycelia. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **58**: 11-16.
- FERRARIS, L.; ABBATTISTA GENTILE, I.; MATTA, A., 1987: Activation of glycosidases as a consequence of infection stress in *Fusarium* wilt of tomato. *J. Phytopathol.*, **118**: 317-325.
- GUPTA, D. P.; HEALE, J. B., 1971: Induction of cellulase Cx in *Verticillium albo-atrum*. *J. Gen. Microbiol.*, **63**: 163-173.
- JOOSTEN, M. H. A. J.; DE WIT, P. J. G. M., 1989: Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β glucanases and chitinases. *Plant Physiol.*, **89**: 945-951.
- KEEN, N. T.; HORTON, J. C., 1966: Induction and repression of endo-polygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Can. J. Microbiol.*, **12**: 443-453.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, M. J.; FARRA, A. L.; RANDALL, R. S., 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265.
- NELSON, H., 1944: A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**: 375-380.
- SANDHU, D. K.; KALRA, M. K., 1982: Production of cellulase, xylanase and pectinase by *Thichoderma longibrachiatum* on different substrates. *Trans. Br. mycol. Soc.*, **79**(3): 409-413.
- SHEWALE, J. G.; SADANA, J. C., 1979: Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtrate for sugar production. *Can. J. Microbiol.*, **25**: 773-783.
- SOMOGYI, M., 1945: A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, **160**: 61-73.
- VÁZQUEZ, C.; MARTÍNEZ, M. J.; LAHOZ, R.; REYES, F., 1986: Effect of calcium and other metal ions on pectic activities from autolysed cultures of *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **37**: 227-230.

(Aceptado para su publicación: 15 enero 1992)